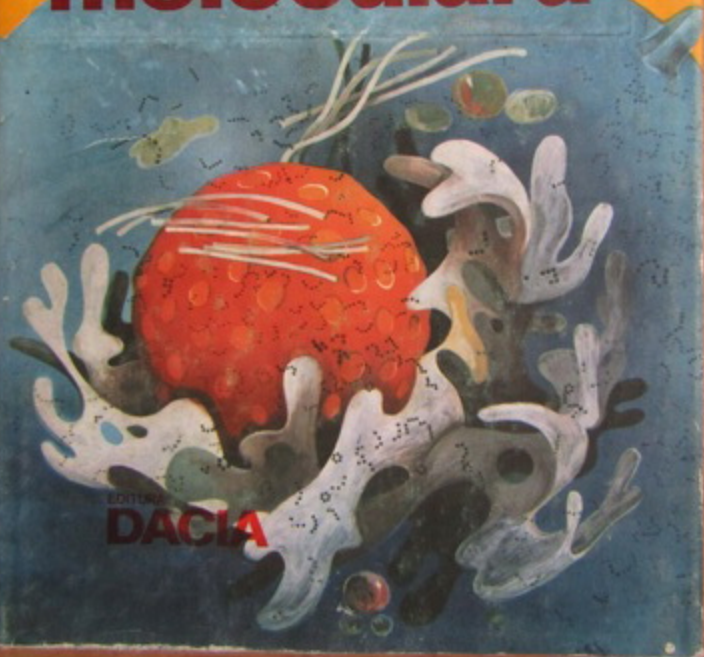


GHEORGHE BENGĂ

Biologie celulară și moleculară



EDITURA
DACIA

GHEORGHE BENGHA

**BIOLOGIE CELULARĂ
ȘI MOLECULARĂ**



PREFAȚA

Biologia celulară și moleculară, reprezintă nu numai unul din cele mai dinamice domenii în care avansează frontierele cunoașterii umane, ci și pilonul fundamental ce stă la baza revoluției biologice a ultimului pătrar al secolului XX, cu implicații de maximă importanță economică, medicală, ecologică și, în ultimă analiză, filozofică.

Gigantica explozie de informații legate de celulă este concretizată în monopolizarea unor reviste de prestigiu destinate inițial tuturor științelor naturii (*Nature*, *Science*, *Proceedings of National Academy of Sciences*) și apariția de noi publicații (*Cell*, *Bioscience Reports*, *Cell and Molecular Biology*, *Cell Calcium*, *Cell Biochemistry and Function*, *Gene*, *European Journal of Cell Biology*, *Cell Biology International Reports*, *Biologie Cellulaire*, *Journal of Membrane Biology*) ce se adaugă celor care, având vechime de 20—30 ani, se pot considera deja „clasice” (*Journal of Cell Biology*, *Experimental Cell Research*, *Journal of Molecular Biology*, *Journal of Cell Science*, *Journal of Ultrastructure Research* etc.), precum și lucrărilor din reviste ca: *Biochimica et Biophysica Acta*, *Biochemical Journal*, *Journal of Biological Chemistry*, *Revue Roumaine de Biochimie*, *Morphology and Embriology* (București), *Studia Biophysica*. Există apoi treceri în revistă de biologie celulară și moleculară în serii ca: *International Review of Cytology*, *Annual Reviews of Biochemistry* (*Ann. Rev. Physiology*), zeci și sute de monografii consacrate unor componente ale celulei, serii de 3—5 volume, cuprinzând capitole scrise de diferiți autori, ce se ocupă doar de membranele celulare, de nucleu, de citoschelet etc. S-au publicat și lucrări monumentale (de mii de pagini) dedicate celulei, sau manuale, opere colective a zeci de autori.

În aceste condiții cel care își ia misiunea, aproape imposibilă, de a scrie singur o carte de biologie celulară și molecu-

lară, și încă într-un spațiu limitat, este pus în situația de a opta pentru o anumită orientare a lucrării și o destinație precisă. M-am decis a scrie o carte care să servească mai multe scopuri și astfel să intereseze un cerc larg de cititori: a) studenți de la facultățile ce au în programă biologia celulară, cărora le dedic un manual bazat pe experiența a 7 ani de predare a cursului la Facultatea de medicină din Cluj-Napoca; b) biologi, biochimiști, biofizicieni, medici, care n-au studiat în facultate acest domeniu sau nu au avut șansa de a-i cunoaște progresele revoluționare din ultimii ani; c) cercetători din domeniile amintite care doresc să aibă la îndemână o sinteză a cunoștințelor „elementare” de biologie celulară și moleculară.

Imaginile de microscopie electronică provin atit din activitatea mea, cît mai ales au fost puse la dispoziție cu amabilitate de reputați oameni de știință și cercetători din țară și din străinătate (vezi lista la legenda fotografiilor) cărora le mulțumesc încă o dată pe această cale.

Imi exprim gratitudinea față de toți aceia care m-au ajutat în realizarea unor schimburi de experiență și documentare în prestigioase laboratoare de biologie celulară și moleculară din țară și din străinătate.

La sfîrșit, dar nu în ultimul rînd, adresez mulțumiri Editurii Dacia și colaboratorilor săi pentru eforturile făcute spre publicarea lucrării în condiții cît mai bune.

Cluj-Napoca, 12 iulie 1985

Dr. Gheorghe Benga
Titularul disciplinei de biologie
celulară
Institutul de medicină și farmacie
Cluj-Napoca

1. INTRODUCERE ÎN BIOLOGIA CELULARĂ ȘI MOLECULARĂ	13
1.1. Obiectul și caracteristica generală	13
1.2. Etape importante în studiul celulei: descoperirea celulei, teoria celulară, citologia clasică.	14
1.3. Orientări moderne: biologia celulară și moleculară	15
1.4. Contribuții românești în studiul celulei	19
1.5. Privire generală asupra celulei ca punct nodal în structuralitatea organismului	21
2. NOȚIUNI GENERALE DESPRE CELULE	26
2.1. Celule procariote și eucariote	26
2.2. Numărul, formele și dimensiunile celulelor eucariote	27
2.3. Schema de organizare morfologică și funcțională a celulei eucariote	28
3. BAZELE MOLECULARE ALE ORGANIZĂRII CHIMICE A CELULEI	34
3.1. Compoziția elementară a materiei vii	34
3.2. Substanțele chimice din celulă	36
3.2.1. Substanțele anorganice	36
3.2.2. Substanțele organice	39
3.3. Unitatea organizării biochimice a celulei	45
4. MATRICEA CITOPLASMATICĂ (HIALOPLASMA, SUBSTANȚA FUNDAMENTALĂ A CITOPLASMEI SAU CITOSOLUL)	47
4.1. Definiție, roluri în celulă	47
4.2. Caracterizarea fizico-chimică a citoplasmei	47
4.3. Diferențierile citoplasmatică: filamentele de miozină, filamentele de actină, filamentele intermediare și microtubulii	49
4.3.1. Filamentele de miozină.	49
4.3.2. Filamentele de actină (microfilamentele și filamentele subțiri)	51
4.3.3. Filamentele intermediare	53
4.3.4. Microtubulii	55
4.4. Citoscheletul	59
4.5. Microtrabeculele	64
5. BAZELE MOLECULARE ALE MOTILITĂȚII CELULARE	66
5.1. Mișcări celulare avînd la bază sistemul actină-miozină	66
5.1.1. Contractia musculară.	67
5.1.2. Alte mișcări avînd la bază sistemul actină-miozină	72

5.1.2.1. Mișcarea de locomoție ameiboidală	72
5.1.2.2. Mișcările din microvilli	75
5.1.2.3. Curenții citoplasmatici	76
5.2. Mișcări celulare având la bază sistemul microtubul-dineină; mișcările cililor și flagelilor	77
5.3. Organite de coordonare a motilității și asamblării microtubulilor: centriolii și corpii bazali ai cililor și flagelilor	79
6. BIOLOGIA MOLECULARĂ A MEMBRANELOR CELULARE	82
6.1. Tipuri de membrane	82
6.2. Organizarea moleculară a membranelor biologice	83
6.2.1. Compoziția membranelor biologice	83
6.2.1.1. Lipidele din membrane	84
6.2.1.2. Proteinele	89
6.2.2. Modele de organizare moleculară a membranelor	90
6.3. Suprafața celulară și glicocalixul	94
6.4. Receptorii din membrane	95
6.4.1. Generalități. Receptorii și semnalizarea chimică între celule	95
6.4.2. Tipuri de receptori	96
6.4.3. Efectele celulare ale legării liganzilor de receptori	97
6.5. Transportul prin membranele biologice	99
6.5.1. Tipuri de transport	99
6.5.2. Transportul pasiv	100
6.5.3. Transportul activ	104
6.5.4. Transportul direct al unor macromolecule prin membrane	108
6.5.5. Transportul prin vezicule: endocitoza, exocitoza și transcitoza	109
6.6. Joncțiunile celulare	113
6.6.1. Joncțiuni de adezivitate: desmozomii	114
6.6.2. Joncțiuni impermeabile: joncțiunile strânse	115
6.6.3. Joncțiunile de comunicare: joncțiunile permeabile și sinapsele	116
6.7. Membrana eritrocitului ca model de plasmalemă	117
6.8. Privire generală asupra implicațiilor membranelor în patologie	120
7. NUCLEUL	123
7.1. Structura nucleului în interfază	123
7.1.1. Poziție, număr, formă, dimensiuni	123
7.1.2. Studiul nucleului în celula vie	124
7.1.3. Structura nucleului (fixat) la microscopul optic și electronic	124
7.1.3.1. Membrana nucleară (sau învelișul nuclear)	125
7.1.3.2. Cromatina nucleară	127
7.1.3.3. Nucleolul	128
7.1.3.4. Carioplasma (sucul nuclear, matricea nucleară)	130
8. CROMOZOMII LA EUCARIOTE	132
8.1. Funcțiile în celule	132
8.2. Cromozomii la eucariote: morfologie, ultrastructură, organizare moleculară	133
8.2.1. Caractere morfologice generale ale cromozomilor	133

8.2.2. Cariotipul : numărul și morfologia cromozomilor, în metafază. Cariotipul uman. Noțiuni despre anomalii cromozomiale	134
8.2.3. Compoziția chimică, ultrastructura și organizarea moleculară a cromozomilor eucariotici (biologia moleculară a cromatinei)	139
9. REPRODUCEREA CELULARĂ	145
9.1. Ciclul celular	145
9.2. Diviziunea celulară	148
9.2.1. Diviziunea directă (amitoza)	148
9.2.2. Diviziunea indirectă	148
9.2.2.1. Mitoza	148
9.2.2.2. Evenimente moleculare în cursul mitozei la nivelul centriolilor, fusului de diviziune și al plasmalemei	150
9.2.2.3. Meioza	153
9.2.2.4. Evenimente moleculare în meioză	157
10. REPLICAREA ȘI BIOSINTEZA ADN. IMPLICAȚII ȘI APLICAȚII MEDICALE : MUTAȚII, SINTEZA REPARATORIE A ADN, INHIBITORII SINTEZEI ADN	160
10.1. Relația dintre structura și replicarea ADN	160
10.2. Replicarea ADN-ului este semiconservativă. Experiența lui Meselson și Stahl	163
10.3. Enzimele și proteinele care intervin în sinteza ADN	165
10.4. Mecanismul molecular al replicării ADN	168
10.5. Particularitățile replicării la eucariote.	169
10.6. Implicații și aplicații medicale ale replicării ADN : mutații, sinteza reparatorie a ADN, inhibitorii sintezei ADN	171
11. TRANSCRIEREA MESAJULUI GENETIC : BIOSINTEZA ACIZILOR RIBONUCLEICI	175
11.1. Structura ARN și conceptul de ARN mesager	175
11.2. Mecanismul molecular al biosintezei ARN-ului la procariote	176
11.3. Particularitățile transcrierii la eucariote	178
11.4. Inhibitorii transcrierii : antibioticele rifamicină și actinomicină	181
12. TRADUCEREA CODULUI GENETIC ÎN BIOSINTEZA PROTEINELOR	183
12.1. Ribozomii : sediul biosintezei proteinelor	184
12.2. ARN de transfer : molecule adaptor, de racordare a aminoacizilor pe mRNA, în biosinteza proteinelor	187
12.3. Mecanismul molecular al biosintezei proteinelor în ribozomi.	189
12.4. Unele particularități ale biosintezei proteinelor	193
12.5. Efectele unor antibiotice și toxine asupra biosintezei proteinelor	197
13. ORGANIZAREA ȘI EXPRIMAREA MATERIALULUI GENETIC LA PROCARIOTE	198
13.1. Tipul particular de organizare a materialului genetic (ADN) la procariote : cromozomi și plasmide	198
13.2. Reglarea biosintezei proteinelor la procariote (reglarea exprimării genelor)	199
13.2.1. Reglarea la nivelul transcrierii	200
13.2.1.1. Modelul operonului	200
13.2.1.2. Alte mecanisme de control al transcrierii	202
13.2.2. Reglarea la nivelul traducerii	203

14. NOȚIUNI DESPRE RECOMBINAREA ADN. ENZIME DE RESTRICTIE, APLICAȚII MEDICALE	204
15. TIPURI PARTICULARE DE ORGANIZARE ȘI EXPRIMARE A MATERIA- LULUI GENETIC LA VIRUSURI	209
16. REGLAREA BIOSINTEZEI PROTEINELOR (A EXPRIMĂRII GENELOR) LA EUCARIOTE ȘI DIFERENȚIEREA CELULARĂ	211
16.1. Reglarea prin modificări directe ale genelor	211
16.2. Reglarea la nivelul transcrierii	212
16.3. Reglarea la nivelul înădării ARN-ului	214
16.4. Reglarea la nivelul traducerii	215
16.5. Reglarea post-traducere (după sinteza lanțului polipeptidic)	215
16.6. Clonarea celulelor eucariote	216
17. RETICULUL ENDOPLASMIC	218
17.1. Ultrastructură și compoziție chimică	218
17.2. Funcții specifice RE rugos	219
17.3. Funcții specifice reticulului endoplasmic neted	222
17.4. Funcții comune RE rugos și neted. Biogeneza membranelor și organitelor celulare	224
17.5. Aplicații medicale.	225
18. APARATUL GOLGI. ULTRASTRUCTURĂ ȘI FUNCȚII	228
19. SECREȚIA CELULARĂ.	233
20. LIZOZOMII	236
20.1. Ultrastructura și funcțiile lizozomilor	236
20.2. Rolul în patologie	238
21. PEROXIZOMII: ULTRASTRUCTURĂ, FUNCȚII, IMPLICAȚII BIOMEDICALE	241
22. MITOCONDRIILE	244
22.1. Morfologie și ultrastructură	244
22.2. Compoziție chimică, procese metabolice și enzime localizate în mitocondrii	246
22.3. Organizarea moleculară a lanțului respirator și a sistemului fosforilării oxidative	248
22.4. Fosforilarea oxidativă	251
22.5. Transportul ionilor prin membrana internă mitocondrială	256
22.6. Biogeneza și originea evoluționară a mitocondriei	258
23. MATRICEA EXTRACELULARĂ ȘI ADEZIVITATEA CELULARĂ	262
23.1. Relația structură-funcție.	262
23.2. Compoziția chimică	262
23.3. Fibronectina și adezivitatea celulară	264
23.4. Membrana bazală ca specializare a matricei extracelulare	264
23.5. Interacțiuni reciproce între celule și matricea extracelulară	265
24. RECUNOAȘTEREA CELULARĂ, CELULA MALIGNĂ, ÎMBĂTRÂNIREA CELULARĂ	266
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ GENERALĂ	271

NOTĂ ASUPRA BIBLIOGRAFIEI

Fiind imposibil a cita miile de surse bibliografice folosite la fiecare capitol, s-au citat numai câteva lucrări esențiale sau foarte recente, iar la bibliografia generală lucrări de larg interes sau folosite pentru mai multe capitole. Selectând bibliografia (până în iunie 1985) am redat și titlurile lucrărilor pentru ca cei interesați să-și poată alege lucrările din domeniul ce-i preocupă.

NOTĂ ASUPRA FOTOGRAFIILOR

Imaginile de microscopie electronică au fost grupate la sfârșitul volumului, pentru a da posibilitatea cititorului să le folosească la citirea diferitelor capitole. S-au depus eforturi pentru a selecționa un minimum de imagini tipice, aranjate în planșe. Mulțumesc și pe această cale dr. Constantin Crăciun, șeful Laboratorului de Microscopie Electronică al Universității din Cluj-Napoca, atât pentru imaginile puse la dispoziție, cât și prin realizarea planșelor în forma lor finală.

1. INTRODUCERE ÎN BIOLOGIA CELULARĂ ȘI MOLECULARĂ

1.1. OBIECTUL ȘI CARACTERISTICA GENERALĂ

Biologia celulară este o ramură a științelor biologice care se ocupă cu studiul structurii și funcțiilor celulelor, care sînt unități fundamentale în alcătuirea organismelor, substratul morfologic și fiziologic al fenomenelor biologice. Biologia celulară studiază structurile funcționale și fenomenele biologice generale comune tuturor celulelor, sau altfel spus, o *celulă ideală* și nu diferite tipuri particulare de celule (neuron, celule epiteliale, celule musculare), cu care se ocupă *histologia*.

Se mai poate spune că biologia celulară are ca obiect dezvoltarea legilor generale de desfășurare a proceselor vitale la nivelul de organizare celulară. Celula poate fi *definită* și ca unitatea elementară a lumii vii, produs al unei îndelungate evoluții, cu o ordine internă complexă, ce-i conferă capacitatea de creștere, dezvoltare și reproducere, precum și cu organizare dinamică, aflată în relații de echilibru cu mediul înconjurător (Diculescu și colab., 1983). Biologia celulară s-a conturat ca o disciplină nouă mai cu seamă în ultimii 35 de ani ca urmare a progreselor revoluționare înregistrate în studiul celulei, pe plan metodologic și conceptual, cînd s-a produs fuziunea dintre citologie, biochimie celulară, fiziologie celulară și genetică moleculară. În ultimul deceniu s-a accentuat tendința de interpretare a tuturor proceselor celulare la nivel molecular, ceea ce justifică denumirea actuală de *biologie celulară și moleculară*, care a devenit una dintre cele mai noi și de perspectivă ramuri ale biologiei. Ea concepe celula ca un adevărat microcosmos, în care structurile și funcțiile se îmbină armonios; activitatea acestui microcosmos este determinată și reglată genetic, astfel că funcționarea sa se realizează cu o mare eficiență.

După cum rachetele sau sondele spațiale înaintînd în Cosmos cu viteze amețitoare permit astăzi descoperirea unor aspecte ale Universului complet nevăzute, ce revoluționează înseși concepțiile omînirii asupra materiei, la fel microcosmosul celular a fost străpuns în ultimii ani de zile de „sondele” reprezentate de noile tehnici de investigare a celulei sau de perfecționarea tehnicilor mai vechi și cunoștințele noi cîpătate au revoluționat concepțiile noastre asupra universului celulei.

1.2. ETAPE IMPORTANTE ÎN STUDIUL CELULEI: DESCOPERIREA CELULEI, TEORIA CELULARĂ, CITOLOGIA CLASICĂ

Deși este o disciplină nouă, în continuu progres, biologia celulară este rezultatul îndelungatei evoluții înregistrate în studiul celulei, atât sub raport *morfologic*, cât și sub raport *funcțional* (Benga, 1980). În general, studiul celulei a progresat datorită perfecționării *metodelor de investigație*, ceea ce a permis acumularea de noi și noi observații, precum și datorită *progreselor conceptuale*, permițând o interpretare mai adecvată a observațiilor vechi și noi.

O primă etapă este reprezentată de *utilizarea microscopiei optice*. Inventat în secolul XVI microscopul optic a permis observarea de către *Robert Hooke* (1665) într-o felie subțire de plută a unor cavități mici dispuse ca într-un fagure de miere, cavități pe care le denumește *celule* (Hooke a observat de fapt pereții de celuloză ai fostelor celule vegetale). Cîțiva ani mai tîrziu olandezul *A. Van Leeuwenhoek* descoperă mai multe tipuri de celule libere: protozoare, globule roșii nucleate din sângele vertebratelor, bacteriile, spermatozoizii. Timp de peste 100 de ani cunoștințele despre celule s-au redus la observații de acest gen.

Secolul XIX se caracterizează prin creșterea numărului de observații microscopice pe diferite specii animale și vegetale, dar mai ales prin apariția pe această bază a unor generalizări importante cu privire la celule. Astfel, *Robert Brown* (1831) redescoperă *nucleul* celular, observat prima dată de *Leeuwenhoek*, ajungînd la concluzia că *nucleul este o componentă constantă și fundamentală a celulei*. Această concluzie este valabilă și astăzi. Hematia, care se dă drept exemplu de celulă fără nucleu, este de fapt o formă adaptativă („un sac plin de hemoglobină pentru transportul oxigenului”), fiind o celulă terminală, ce provine din celule nucleate. Trombocitele sau plăcuțele sanguine nu sînt considerate celule propriu-zise, ci sînt fragmente citoplasmice desprinse din megacariocite.

Ceva mai tîrziu, în 1836, *Valentin* descoperă *nucleolul* în interiorul nucleului. Unii cercetători denumesc *protoplasmă* conținutul celulei. De la ideea primitivă de celulă se ajunge astfel la conceptul că celula este o masă de protoplasmă limitată în spațiu de o membrană celulară și posedînd un nucleu. Protoplasma ce înconjoară nucleul devine cunoscută sub numele de *citoplasmă*, spre a o distinge de *carioplasmă*, protoplasma nucleului.

O generalizare de o importanță deosebită este elaborarea *teoriei celulare* de către botanistul *Schleiden* și zoologul *Schwann* (1839), pe baza concepției exprimate după 1800 de mai mulți autori că celula reprezintă ceva fundamental în organizarea materiei vii. Teoria celulară a lui *Schleiden* și *Schwann* poate fi rezumată astfel: — corpul tuturor plantelor și animalelor este format din celule sau din substanțe ce provin din celule; — celulele au o viață a lor, proprie fiecărei celule; — această viață individuală a celulelor este dominată de viața în ansamblu a organismului.

Această formulare inițială poate fi considerată azi ca o primă teză a teoriei celulare. Ulterior a fost completată cu alte două teze: 2) toate

celulele provin din celule preexistente (axioma celebră a lui Virchow: „omnis cellula e cellula”); 3) toate celulele plantelor și animalelor provin din diviziunea și creșterea unui ou fecundat, el însuși format din unirea altor două celule, spermatozoidul și ovulul.

Elaborarea teoriei celulare constituie una dintre cele mai de seamă generalizări din biologie. Prin aceasta s-a reliefat unitatea structurală a lumii vii, a regnului animal și vegetal. Teoria celulară este una din descoperirile din domeniul științelor naturii care a stat la baza elaborării materialismului dialectic de către Marx și Engels. „Abia cu această descoperire — subliniază Engels în *Dialectica naturii* — atât anatomia și fiziologia comparată, cât și embriologia au căpătat un fundament solid. Misterul care învăluia apariția, creșterea și structura organismelor a fost înlăturat; miracolul până atunci de neînțeles a apărut ca un proces care se desfășoară potrivit unor legi în esență identice pentru toate organismele”.

Ca urmare a perfecționării microscopiei optice, în a doua jumătate a secolului XIX se acumulează observații importante. Se descoperă *diviziunea directă sau amitoza (Remak)* și *diviziunea indirectă* la animale (*Flemming*) și la plante (*Strasburger*), numită *cariocineză* sau *mitoză (Flemming în 1880)*. S-a observat că fundamentală pentru mitoză este formarea cromozomilor (*Waldeyer în 1890*). Tot în această perioadă se descriu și organele citoplasmice: centrul celular (*Van Beneden, Boveri*), mitocondriile (*Altman, Benda*), aparatul reticular intern denumit azi aparatul Golgi, după numele descoperitorului, *C. Golgi*.

La sfârșitul secolului XIX studiul celulei apare ca o ramură separată a biologiei, care a primit numele de *citologie*, majoritatea cunoștințelor fiind obținute prin observarea la microscopul optic a celulelor colorate și a secțiunilor de țesuturi. De remarcat că încă din 1859 *R. Virchow* a publicat o *Patologie celulară* (care, cu toate limitele sale, marchează începutul histopatologiei moderne), iar în 1884, *I. Carnoy* o *Biologie celulară*, pentru ca tratatul lui *O. Hertwig: Celula și țesuturile (1892)* să aducă o sinteză a cunoștințelor de până atunci, ajungându-se prin aceasta la fondarea unei ramuri separate a biologiei numită *citologie*, cu caracter predominant morfologic, având ca principală metodă de studiu microscopia optică. Începutul fiziologiei celulare se poate asocia cu tratatul de *Fiziologie generală (1897)* al lui *M. Verworn*.

1.3. ORIENTĂRI MODERNE: BIOLOGIA CELULARĂ ȘI MOLECULARĂ

Secolul XX înregistrează progrese însemnate în studiul celulei, atât sub raport metodologic, cât și sub raport conceptual. Printre *progresele metodologice* sînt de menționat: introducerea tehnicii *culturilor de țesuturi in vitro (Harrison în 1909)*, ulterior a *culturilor de celule*, care permit studierea comportării celulelor prin microscopie de contrast de fază, colorație vitală și microvitală și microcinematografie; *microchirurgia (Kite în 1911)*, prin care se introduc micropipete fine în interiorul celu-

lei și se studiază la microscopul optic proprietățile fizico-chimice ale citoplasmei; alte progrese metodologice revoluționare s-au înregistrat în studiul celulei sub raport morfologic și sub raport funcțional. Astfel, *introducerea microscopului electronic* (inventat prin 1937, dar utilizat cu succes în biologie după 1954) a dus la descoperirea unei noi lumi a organizării celulare, descifrarea ultrastructurii celulei, a detaliilor fine de organizare submicroscopică. Aceasta a marcat și trecerea de la citologia clasică la *citologia modernă*.

Începutul secolului XX marchează și dezvoltarea impetuoasă a biochimiei. Se descifrează și descoperă oxidările celulare (*Wieland* în 1903 și *Warburg* în 1908) și se fac primele încercări de a le localiza în particule citoplasmice. Dar există o ruptură între citologi, care nu sesizau importanța abordărilor biochimice, și biochimisti, care puneau accentul pe chimia organică și studiau reacțiile enzimatice fără a urmări localizarea lor în celulă, deci fără a manifesta interes în structura celulei.

Punctul de convergență între citologie și biochimie îl constituie dezvoltarea tehnicilor biochimice de *fracționare a celulei prin centrifugare diferențială*. Această linie de cercetare a fost inițiată în 1934 de *Bensley* și *Hoerr* și apoi dezvoltată cu succes de *Claude*, *Hogeboom* și alții în deceniul al V-lea. Prin centrifugare diferențială s-a realizat separarea componentelor citoplasmei, urmată de studiul ultrastructurii și a proprietăților metabolice ale acestora. În acest fel s-au putut localiza precis anumite căi metabolice în celulă (de pildă ciclul Krebs, oxidările celulare și sinteza de ATP în mitocondrii) și s-au descoperit și caracterizat noi organele celulare (lizozomi și peroxizomi de către *Christian de Duve*).

Introducerea microscopiei electronice și a fracționării celulei prin centrifugare sînt cele două tehnici majore care au revoluționat studiul celulei, ducînd la apariția unei noi ramuri a științelor biologice și anume *biologia celulară*.

În același timp studiul celulei a progresat și în urma perfecționării *tehnicilor de citochimie și histochimie*, prin care se decelează anumite componente ale celulei (acizi nucleici, proteine, glucide, lipide), se localizează enzime în celulă sau în organite. Aceste metode se pot utiliza la microscopul optic sau la microscopul electronic. Un punct de referință l-a constituit citofotometria acizilor nucleici (*Caspersson* în 1938). De asemenea s-au aprofundat aspectele funcționale ca urmare a progreselor înregistrate în fiziologia celulară. Pe de altă parte, pornind de la structurile nucleare s-a ajuns la interpretarea și explicarea fenomenelor eredității.

Sub raport conceptual biologia celulară a rezultat din fuziunea disciplinelor de citologie, biochimie celulară, fiziologie celulară, genetică moleculară. Prin anii 60' exista deja o disciplină formată, cu o metodologie complexă de cercetare, ilustrată de savanți de renume mondial dintre care *Albert Claude*, *George Palade*, *Christian de Duve*, laureați ai Premiului Nobel în 1974, și *Keith Porter* pot fi considerați „ctitori” ai biologiei celulare.

Dar progresele spectaculare în studiul celulei au continuat cu repeziciune și în scurtă vreme s-a înregistrat o nouă schimbare radicală. Odată cu realizările excepționale înregistrate în descifrarea structurii proteinelor și acizilor nucleici prin folosirea în special a difracției cu

raze X, a elucidării mecanismului replicării ADN, a biosintezei proteinelor, deci a transmiterii informației genetice și a expresiei genei s-a născut *biologia moleculară*, al cărei scop este *interpretarea fenomenelor biologice în termeni moleculari*. Cunoștințele de biologie moleculară trebuie însă și ele integrate în studiul celulei, de aceea unii autori (Du Praw 1968) remarcă insuficiența termenilor de biologie celulară (care într-o accepțiune restrânsă nu se ocupă de biosinteza proteinelor și acizilor nucleici) și de biologia moleculară (care lasă la o parte cunoștințe valoroase de biologie celulară „clasică”). De aceea, cel mai potrivit este numele de *biologie celulară și moleculară*, sau *biologie moleculară a celulei*. (Biologia moleculară este un concept de studiere a materiei vii prin prisma relației structură-funcție la nivel molecular. Se poate vorbi astfel de biologie moleculară a genei, a membranelor, a virusurilor etc.).

Dezvoltarea biologiei celulare contemporane are loc în cele două direcții, care au dus și la nașterea acestei științe; perfecționarea tehnicilor de investigare a celulei, pe de o parte, și progresele conceptuale, pe de altă parte.

1. Dintre principalele *tehnici de investigare* a celulei putem enumera pe acelea folosite cu succes în ultimii ani.

A. *Microscopia optică* a fost revitalizată în ultimii ani; de pildă microscopia de fluorescență a permis observarea citoscheletului, a mobilității componentelor subcelulare, ca și identificarea lor prin anticorpi marcați fluorescent.

B. *Microscopia electronică* a cunoscut perfecționări ale tuturor variantelor sale. Astfel, a crescut foarte mult rezoluția *microscopiei electronice de transmisie* și au fost puse în slujba biologiei în câteva centre din lume microscopie electronice cu voltaj supraînalt (1.000.000 V). Aceasta a permis observarea în substanța fundamentală a citoplasmei a unei organizări mai fine decât citoscheletul, sub forma unei rețele de *microtrabecule*, de zece ori mai subțiri decât cele mai fine filamente ale citoscheletului. De asemenea microscopia cu voltaj supraînalt a permis observarea pentru prima dată a unor celule vii la microscopul electronic și a dus la imaginea surpriză a mitocondriei unice per celulă, ca un arbore ramificat în toată citoplasma, iar ceea ce vedem pe secțiuni și numim mitocondrii nu ar fi decât ramuri selecționate la diferite nivele. *Tehnica de crio fracturare* urmată de examinarea replicii la microscopul electronic de transmisie a permis evidențierea unor detalii de organizare moleculară a membranelor celulare. Atașarea la microscopul electronic a posibilității de *analiză cu raze X* a elementelor chimice din care se compun structurile observate la microscopul electronic și folosirea de *markeri specifici* diferitelor grupări din membrane sînt de asemenea progrese recente. Demnă de semnalat este accentuarea tendinței de folosire a microscopiei electronice în *studii funcționale* prin combinarea cu metode biochimice, secțiuni seriate, autoradiografie, direcție introdusă de G. E. Palade în studiile privind secreția celulară și continuată cu succes de colaboratori ai săi în studiul reciclării membranelor sau al transportului transendotelial prin vezicule (diacitoza sau transcitoza).

C. *Fracționarea celulei prin centrifugare diferențială* a fost, în ultimii ani, perfecționată și standardizată pentru obținerea în stare pură a

oricărei componente celulare, dar și pentru izolarea unor ansambluri din celulă: aparatul mitotic, aparatul Golgi etc.

D. *Tehnicile fizice de biologie moleculară* cunosc o deosebită dezvoltare în ultimii ani. *Difracția razelor X*, tehnica ce a produs o revoluție în biologie prin descifrarea structurii spațiale a proteinelor și acizilor nucleici, combinată cu microscopia electronică, a permis obținerea imaginii structurii tridimensionale a unor ansambluri de exemplu bacteriorodopsina inserată în membrana bacteriei *Halobacterium halobium*. *Metodele cu neutroni* (difracție, dispersie) au permis descifrarea organizării moleculare a cromatinei, substanța din care sînt formați cromozomii, prin descrierea nucleozomilor ca unitate fundamentală de organizare a cromatinei la eucariote.

Rezonanța magnetică nucleară de înaltă rezoluție a fost utilizată în elucidarea interacțiunilor moleculare în membranele biologice, dar și în studii metabolice pe celule intacte. De mare actualitate sînt și cercetările de rezonanță în impulsuri, tehnică prin care se determină timpî de relaxare ai unor atomi din biomolecule sau este folosită în studiul permeabilității membranelor (pentru apă, ioni etc.). *Rezonanța electronică de spin* cunoaște o expansiune puternică în ultimii ani prin folosirea unor markeri specifici, substanțe cu electroni impari ce se pot atașa oricărei structuri celulare (ADN, proteine, la centrul activ al enzimelor, de componentele membranei) dînd informații la nivel molecular, imposibil de obținut prin alte metode.

Tehnicile de spectrofluorimetrie au evoluat permițînd aprecierea prin probe fluorescente a vîscozității membranelor, a difuziunii sau rotației proteinelor membranei. S-au introdus chiar probe specifice pentru jumătatea externă sau internă a membranei eritrocitare.

E. *Tehnicile biochimice de biologie moleculară* au ajuns de neîndoie, atît ca o completare a tehnicilor amintite, cît și în mod independent. Astfel, prin *electroforeză în gel de poliacrilamidă* s-au studiat proteinele diferitelor părți ale celulei sau acizii nucleici, iar combinată cu autoradiografia a devenit o tehnică de bază în manipulările genetice. *Marcările prin fotoafinitate* a unor părți din moleculele integrate în structuri celulare (subunități ale proteinelor de membrană sau centrii activi ai enzimelor), dar mai ales *reconstituiri de structuri și funcții celulare* din componente purificate din celulă constituie o direcție de cercetare foarte actuală.

F. *Tehnici complexe de biologie celulară și moleculară* dezvoltate mai cu seamă în anii din urmă au dus la elaborarea de *tehnologii de biologie celulară și moleculară complexe*, bazate pe culturi de celule, fuziuni celulare, purificări de gene și altele. Printre noile tehnologii se pot enumera: *tehnologia ADN recombinat*, *producerea de anticorpi monoclonali prin tehnologia hibridomelor*, studiile privind mecanismele reglării exprimării genei, sinteza artificială a genelor și manipulările genetice.

Panorama progreselor tehnicilor de investigare a celulelor, departe de a fi completă, ilustrează totuși dinamismul biologiei celulare contemporane.

2. *Progresele conceptuale* din anii din urmă au avut loc în mai multe direcții:

A. *Fuziunea* sau convergența informațiilor primite din diferite discipline (morfologia celulară, biochimia și biofizica celulară, fiziologia celulară și genetica moleculară) ce a dus de fapt la „nașterea” biologiei celulare, are în prezent două tendințe noi. Una este aceea de lărgire a sferei fuziunii cu alte discipline. Astăzi în „furnalul” biologiei celulare „s-au topit” și concepțiile, informațiile altor domenii, ca imunologia celulară și moleculară, farmacologia celulară, virusologia și altele. Rezultatul este, la „ieșirea din furnal și cristalizarea” concepțiilor noastre, imaginea unei celule complexe, în care se desfășoară procese de cea mai mare importanță pentru înțelegerea esenței vieții, cu importanță practică medicală și în alte domenii. A doua tendință este accentuarea fuziunii, a convergenței biologiei celulare cu biochimia și cu genetica. Dovadă este și faptul că în ultimii ani premiile Nobel pentru medicină și fiziologie au fost monopolizate de recunoașterea unor descoperiri legate de celule, dar tot pentru acestea s-au acordat și premii Nobel pentru chimie și fizică.

B. *Molecularizarea* constituie trăsătura fundamentală a biologiei celulare contemporane. Interesantă este și schimbarea denumirii unui prestigios manual avînd autor pe argentinianul *De Robertis* și colab. Edițiile dintre 1946—1965 au apărut ca „*General Cytology*”, cele din 1970 și 1975 ca „*Cell Biology*”, iar cea din 1980 sub titlul „*Cell and Molecular Biology*”, ceea ce ilustrează perfect conținutul disciplinei contemporane.

C. *Integrarea* informațiilor primite prin toate metodele și la toate nivelele constituie o altă caracteristică a dezvoltării biologiei celulare contemporane. *Biologia moleculară a celulei* studiază în mod unitar aspectele vizibile la microscopul optic, ultrastructurile revelate de microscopul electronic, mergînd apoi în profunzime pînă la detaliile de organizare moleculară obținute cu tehnicile amintite, dar în final se integrează datele furnizate în construirea imaginii complexe a celulei.

În acest concept dezvoltarea viitoare a biologiei celulare este nelimitată. Azi cunoaștem vîrfurile unui iceberg, a cărui parte ce n-o vedem este infinită, dar din care vom explora cu siguranță din ce în ce mai mult, în scopul îmbunătățirii sănătății, a vieții omului, a condiției umane pe Terra.

1.4. CONTRIBUȚII ROMÂNEȘTI ÎN STUDIUL CELULEI

În secolul trecut s-a impus școala de microscopie de la Facultatea de medicină din București (Diculescu și colab., 1983). Încă din 1839 *Nicolae Kretzulescu* publică la Paris rezultatele cercetărilor sale asupra structurii microscopice a dinților și a mediilor transparente ale globului ocular. Învățămîntul disciplinelor microscopice apare la școala de medicină din București în anul 1859, reprezentat succesiv de *Ludovic Fiala*, *Gh. Polizu*, și *Mihail Obedenaru*, care predau histologia și citologia pînă în anul 1879, cînd ia ființă o catedră independentă de histologie, citologie și tehnică microscopică. La această catedră, printre primele de acest

fel din Europa, după cele din Franța, se succed, în curs de circa 100 ani, reprezentanți de seamă ca: *Mihail-Petrini-Galați*, *Alexandru Obredja*, *Ion Bruckner*, *Ștefan Besnea*, *I. T. Niculescu*.

Pe plan internațional se impun în mod cu totul deosebit, *Gheorghe Marinescu* (1863—1938), *Victor Babeș* (1854—1926) și *Ion Cantacuzino* (1863—1934). Contribuțiile lui *Gheorghe Marinescu* în neurocitologie sînt sintetizate în cartea „*Celula nervoasă*” (publicată la Paris în 1909) care a rămas mai multe decenii o carte de bază a domeniului. *Victor Babeș* (coautor împreună cu francezul *A. V. Cornil* al primului tratat de microbiologie din lume, publicat la Paris în 1886) a descoperit peste 40 microorganisme, unele constituind clasa *Babesia*. (Babesiozele sînt cele mai răspîndite parazitoze ale animalelor).

Victor Babeș a mai descoperit corpii *Babeș-Negri* în neuron în turbare, corpusculii *Babeș-Ernst* în bacilul difteric. Încă din 1885 a prevăzut că între microorganisme se pot stabili relații antagoniste, cu posibilități de aplicare a fenomenului în terapie, concepție confirmată ulterior prin antibiotice. *Ion Cantacuzino*, pe lângă contribuțiile sale de imunologie comparată, de microbiologie și de medicină experimentală, a descoperit factorul stimulator al secreției celulare în diferite lichide biologice (de exemplu, lacrimile).

Școala de citofiziologie a lui *Ioan Athanasiu* și *Ion Drăgoi* de la facultățile de științe naturale și medicină veterinară din *București* aduc valoroase contribuții de citofiziologie musculară, dintre care se remarcă descoperirea tubilor transversi din celulele musculare cardiace și cele striate, lucrări publicate încă înainte de primul război mondial.

În perioada dintre cele două războaie mondiale școala de citologie de la *Facultatea de științe naturale din București* este reprezentată strălucit de *Dimitrie Voinov* (și continuată de *Theodor Dornescu* și *I. Steopoe*), iar cea de la *Cluj* de către *I. Scriban*, care s-au impus prin descoperiri legate de aparatul Golgi și lucrări de citologie animală (*Ionescu-Varo* și colab., 1981).

În aceeași perioadă *Ion Drăgoi*, conducînd școala de histologie și citologie la *Facultatea de medicină din Cluj* a efectuat cercetări deosebit de valoroase privind rolul presiunii osmotice asupra diviziunii celulare, precum și asupra respirației ovocitelor de mamifere.

Învățămîntul superior și cercetarea științifică din România au depus eforturi de reorganizare în concordanță cu evoluția biologiei celulare în ultimele decenii. Începînd cu anul 1969 *M. Ionescu-Varo* inițiază la *Facultatea de biologie* din *București* primele cursuri și lucrări practice de biologie celulară, publicînd totodată și primul manual de profil din țară.

I. Diculescu și colaboratorii de la *catedra de histologie și citologie a Facultății de medicină din București* publică prima monografie de biologie celulară din literatura română (*Diculescu* și colab., 1971).

Începînd cu anul universitar 1978—79 se introduce biologia celulară ca materie obligatorie în planul de învățămînt la facultățile de medicină, disciplinele de profil fiind conduse de *I. Diculescu* la *București*, *O. Chita* la *Craiova*, *G. Cotrutz* la *Iasi*, *Silvia Andreicuț* la *Tg-Mureș*, *N. Frăsinel* la *Timișoara* și *Gh. Benga* la *Cluj-Napoca*.

Se redactează cursuri litografiate pentru studenții în medicină (Benga, 1980; Diculescu și colab., 1981; Andreicuț, 1982) și un manual unic (Diculescu și colab., 1983).

Trebuie apoi menționate laboratoarele de microscopie electronică și biologie celulară și moleculară din cadrul unor institute de învățământ superior (Universitatea din Cluj-Napoca — dr. C. Crăciun, laboratorul de microscopie electronică) și de cercetare: Institutul „Dr. I. Cantacuzino” (microscopie electronică — dr. A. Petrovici, biologie celulară — dr. Gh. Gancevici), Institutul „Dr. V. Babeș” (biologie celulară — dr. C. Dragomir), Institutul „L. Pasteur” (microscopie electronică cu baleiaj — dr. N. Manolescu), Institutul „Ștefan S. Nicolau” (biologie moleculară — dr. L. Popa, dr. S. Antohi), Institutul Oncologic București (biologie moleculară — dr. I. Voiculeț) și altele.

Din 1979 a luat ființă „Institutul de Biologie și Patologie Celulară” din București, realizare importantă a statului nostru, aflată în legătură permanentă cu Secția de biologie celulară de la Facultatea de medicină din Yale, S.U.A. (profesor *George Emil Palade*).

Merită subliniate în acest context, descoperirile de o valoare inestimabilă ale lui *G. E. Palade*, primul român laureat al Premiului Nobel. Aprecierile de „principal cartograf al celulei” sau „cel mai mare biolog al secolului XX” (Blobel, 1980) sînt justificate nu numai de multiplele sale descoperiri, ci și de orizonturile noi deschise în biologia celulară. Palade este unul dintre pionierii elaborării tehnicilor de microscopie electronică (a pus la punct metoda de fixare și selecționare ultrafină, ce i-a permis observarea pentru prima dată a multor structuri celulare) și de centrifugare diferențială (a introdus zaharoza ca mediu de fracționare). A descoperit ribozomii (numiți și „granulele lui Palade”) și a precizat rolul lor în sinteza proteinelor, a elucidat calea secreției celulare, a descoperit transportul pe calea veziculelor prin endoteliul capilar și reciclarea membranelor celulare. În prezent se ocupă de biogeneza membranelor și aici fiind un deschizător de drumuri.

1.5. PRIVIRE GENERALĂ ASUPRA CELULEI CA PUNCT NODAL ÎN STRUCTURALITATEA ORGANISMULUI

În istoria științelor metodologia de cercetare a naturii a fost diferită în funcție de epoca dată. Astfel, în evul mediu a dominat *metoda scolastică*, neștiințifică, ce consta în comentarea textelor permise. Secolele XVI—XVIII marchează apariția *metodei analitice (carteziană)*, prima metodă științifică de cercetare a naturii. În biologie această metodă constă în analiza cît mai profundă a structurilor și mecanismelor proceselor biologice, ceea ce a dus la o acumulare masivă de material factic. Totuși, metoda analitică are ca neajuns principal tendința de a explica legile, proprietățile întregului prin reducerea lor la legile, proprietățile părților componente (*reducționism*). În secolul XIX gîndirea evoluționistă se concretizează în *metoda istorică (darwiniană)*, conform căreia fiecare struc-

tură sau funcție biologică caracteristică materiei vii este privită ca rezultat al unui proces de dezvoltare în timp a vieții (dezvoltare istorică). Metoda analitică și cea istorică nu sînt opuse, ci ele au caracter complementar, ceea ce face necesară aplicarea lor concomitentă; un asemenea exemplu îl constituie teoria sintetică a evoluției. Teoria sintetică are însă ca neajuns principal neglijarea unui aspect esențial, cel al organizării materiei vii.

Metoda sistemică, luînd în considerare în primul rînd acest aspect, consideră că întreaga materie, atît cea lipsită de viață (ne-vie) cît și cea vie, este organizată în sisteme ierarhizate: orice sistem este alcătuit din subsisteme și este, la rîndul său, o parte componentă (subsistem) a unui sistem mai cuprinzător. Esența metodei sistemice constă în abordarea studiului oricărui sistem biologic ținînd seama de poziția sistemului dat în ierarhia sistemică. Relevînd existența unor însușiri și legi comune tuturor sistemelor biologice, dar ținînd seama și de faptul că sistemele nu sînt echivalente, metoda sistemică permite stabilirea legilor specifice fiecărui nivel de organizare a materiei vii (Botnariuc, 1976).

Prin *sistem* se înțelege un *ansamblu de elemente* aflate în interacțiune, unite prin conexiuni într-o formațiune mai complexă și relativ stabilă, formațiune care se comportă ca un întreg cu proprietăți și funcții proprii, distincte calitativ de proprietățile elementelor componente.

În raport cu sistemul, *structura* ne apare ca un complex unitar de interacțiuni, care integrează *elementele* în *întreg*, conferind sistemului caracter omogen și continuu, determină stabilitatea și identitatea sistemului. Într-o altă formulare, structura reprezintă relațiile spațiale și temporale dintre elementele componente ale sistemului. *Funcția* reflectă rolul elementului component în sistem, reprezintă activitatea desfășurată de acel element în așa fel, încît, în ultimă instanță, duce la menținerea întregului.

În perspectiva științei contemporane orice domeniu al existenței se prezintă ca un ansamblu de sisteme cărora le sînt subordonate subsisteme. *Structuralitatea* este deci o proprietate universală a existenței ce rezultă din constituirea succesivă a tuturor sistemelor unele din altele, din organizarea lor în niveluri de structuri omogene și relativ stabile. Relația dintre elemente și sistem, între subsisteme și sisteme este relația dialectică dintre părți și întreg. Elementele se comportă ca părți în sistemul în care se integrează și ca sisteme, în raport cu propria lor structură, cărora le sînt subordonate alte sisteme.

Materia vie prezintă o ierarhie complexă de sisteme succesive, de diferite ordine și grade de complexitate. Ierarhia sistemelor biologice reprezintă o problemă foarte discutată, existînd o mare diversitate de păreri și diferențe în terminologia folosită. Botnariuc (1976) delimitează două noțiuni: nivelurile de integrare a materiei vii și nivelurile de organizare a materiei vii.

Nivelurile de integrare a materiei vii ar fi totalitatea sistemelor ierarhizate cuprinse într-un sistem biologic dat, de pildă într-un organism: sisteme subatomice și atomice, moleculare și macromoleculare, celule, țesuturi, organe, complexe de organe (aparate sau „sisteme”). Deci într-un organism există un șir ierarhic de sisteme integrate, ce reprezintă ierarhia morfofiziologică sau individuală. Aci sînt cuprinse atît sisteme

nebiologice, lipsite de viață (particule subatomice, atomi, molecule), cât și sisteme biologice (celule, țesuturi etc.). Termenul superior al acestei linii ierarhice este individul (organismul) de sine stătător. La organismele unicelulare (protiste) componența ierarhiei morfofiziologice se oprește la celulă.

Ierarhia *nivelurilor de organizare a materiei vii* cuprinde numai sistemele biologice (deci atomii, moleculele, macromoleculele nu sînt considerate ca nivele de organizare a materiei vii) și poate fi denumită ierarhia supraindividuală. În această concepție ar exista următoarele nivele de organizare a materiei vii: organismul (individul), populația (grupuri de indivizi aparținînd aceleiași specii), biogeocenoza sau ecosistemul (comunitățile de viețuitoare împreună cu mediul de trai) și biosfera (totalitatea ecosistemelor de pe planeta noastră).

Alți autori consideră ca niveluri de organizare a materiei vii și sistemele din ierarhia individuală, nu numai din ierarhia supraindividuală.

Indiferent ce poziție am adopta este clar că celula reprezintă un punct nodal în structuralitatea organismului. În ideea nivelurilor de integrare celula este primul sistem biologic, deoarece așa cum s-a spus nivelurile inferioare, atomi, molecule etc., nu sînt considerate „vii”. Pe de altă parte în ierarhia nivelurilor de organizare celula poate fi primul termen al ierarhiei supraindividuale (în cazul organismelor unicelulare).

Oricare ar fi gradul și nivelul sistemului biologic, orice manifestare vitală are loc pe fundamentul organizării celulare, sau, cum s-a spus „viața începe de la celulă”. Indiferent că este vorba de nivelul organizării indivizilor, al populațiilor (speciilor) sau biocenozelor, funcționarea lor este posibilă în primul rînd datorită organizării celulare a materiei vii.

Considerînd celula ca sistem, se pot distinge cîteva caracteristici ale acesteia. În primul rînd, din punct de vedere termodinamic, celula este un *sistem deschis*, adică un sistem care schimbă atît energie cît și substanță cu mediul ambiant. Pe de altă parte, oricărui sistem biologic i se pot descrie mai multe însușiri generale: caracterul istoric, caracterul informațional, programul, echilibrul dinamic, autoreglarea și caracterul răspunsurilor sistemului autoreglabil, heterogenitatea internă, integralitatea.

Celula are un *caracter istoric*, celulele procariote apărînd pe Pămînt acum 3,5 miliarde de ani, iar eucariotele acum 1,5 miliarde de ani. Întreaga evoluție a plantelor și animalelor începe de la organismele unicelulare (protiste).

Caracterul informațional constă în aceea că în orice moment celulele recepționează, acumulează, prelucrează și transmit informații de tot felul. Modelul cibernetic complex după care funcționează celula este reprezentat în primul rînd de codul genetic.

Programul este o trăsătură legată de capacitățile structurale și funcționale ale sistemului. Structura unui sistem biologic oarecare nu este rigidă; fiecare sistem are capacitatea de a realiza diferite stări în funcție de relațiile cu mediul schimbător. Aceste stări nu pot depăși anumite limite impuse de capacitățile structurale și funcționale ale sistemului. Un program reprezintă una din stările posibile pe care le poate realiza sistemul, în limitele permise de organizarea sa. În orice sistem putem distinge trei categorii de programe: — programe „pentru sine”, care asigură

autoconservarea sistemului dat; — programe inferioare, adică programele subsistemelor componente; în cazul celulei acestea sînt programele organelor, ale complexelor moleculare; — programe superioare, care asigură existența sistemului superior, în care este integrat sistemul considerat.

O ilustrare a ierarhiei programelor o constituie modificările celulelor scoase dintr-un țesut (sistem superior) și cultivate în mod izolat, care se diferențiază, devenind asemănătoare indiferent de sursa din care provin (piele, os, rinichi, ficat etc.). În cultură se mențin programele „pentru sine”, care asigură persistența celulelor, în schimb dispare programul superior ce reflectă specificul celulei în cadrul țesutului și al organismului.

Echilibrul dinamic sau starea staționară este caracteristică sistemelor biologice și celulei; aceasta nu este niciodată într-un adevărat echilibru, ci într-un schimb continuu de materie și energie cu mediul exterior, tinzînd mereu spre un regim constant de activitate numit stare staționară sau echilibru dinamic. În timp ce sistemele nebiologice evoluează întotdeauna în sensul creșterii entropiei, deci în sensul creșterii dezordinii lor și al realizării echilibrului termodinamic, sistemele biologice au capacitatea de a compensa creșterea entropiei și de a o depăși pe seama surselor de energie exterioare sistemului, deci au comportament anti-entropic. Organismele vii evită creșterea entropiei prin preluarea din mediu a unei entropii negative, negentropia.

Prin autoreglare sistemele biologice își controlează procesele interioare în funcție de relațiile cu mediul. Influențele mediului tind permanent să dezechilibreze sistemul, care contracarează acțiunile mediului reglîndu-și procesele interioare într-un sens favorabil persistenței sale în timp și spațiu. Sistemele biologice, inclusiv celula, posedă mecanisme de autoreglare de tipul celor descrise în cibernetică. Autoreglarea presupune existența a minimum două elemente: unul care comandă și unul efector, precum și a legăturilor de comunicare dintre ele. Răspunsurile sistemului sînt comparate permanent cu comanda. De pildă calitatea răspunsului este comunicată de la efector din nou receptorului care a primit semnalul inițial, funcționarea receptorului modificîndu-se în raport cu efectul produs. Această legătură este conexiunea inversă (retroacțiunea, „feed-back”), spre deosebire de legătura de la receptor la efector care poartă numele de conexiune directă.

În privința *caracterului răspunsurilor unui sistem autoreglabil* față de stimulii ce acționează asupra lui trebuie precizat că răspunsurile sînt orientate în sensul contracarării stimulilor care tind să dezechilibreze sistemul, deci în sensul menținerii echilibrului dinamic al sistemului.

Heterogenitatea internă reprezintă însușirea unui sistem biologic de a fi alcătuit din elemente mai mult sau mai puțin diferite. Heterogenitatea internă a celulei reiese clar din structura, ultrastructura și organizarea moleculară a compartimentelor celulare. De menționat că și acele componente care prin anumite metode apăreau omogene s-au dovedit heterogene cînd s-au studiat cu metode mai perfecționate. De pildă hialoplasma, omogenă la microscopul optic, este heterogenă la microscopul electronic, unde s-au evidențiat filamente și microtubuli cu structură moleculară complexă. Se poate afirma că în privința heterogenității interne

celula se dovedește inepuizabilă; de aceea se vorbește de universul celei sau de microcosmosul celei.

Integralitatea constă în faptul că un sistem nu se reduce la suma însușirilor părților sale componente; sistemul, privit ca un întreg, prezintă însușiri structurale și funcționale noi, pe care nu le au părțile lui componente luate izolat. Integralitatea este o trăsătură caracteristică a celulelor, în sensul că nucleul sau citoplasma nu trăiesc izolate, celula nu poate supraviețui după distrugerea mitocondriilor etc.

Integralitatea este de fapt rezultatul interacțiunii extrem de complicate dintre componentele celei. Datorită integralității sînt posibile funcțiile biologice fundamentale: metabolismul, menținerea stabilității stării diferențiate, reproducerea și adaptarea. Asemenea funcții nu pot fi reduse la sumarea rolurilor fiziologice ale constituenților celulari. Cu cît stadiul diferențierii este mai înaintat, cu atît interdependența dintre structurile generale va fi mai mare, integralitatea crește. De asemenea integralitatea dintre țesuturi, organe etc. în cadrul organismelor crește atît în cursul dezvoltării ontogenetice, cît și în filogenie, prin apariția sistemelor de reglare superioare: nervos, endocrin. În cadrul sistemelor evoluatelor componente celulare devin foarte dependente de întreg; de pildă neuronii nu se mai divid, nu mai sintetizează ADN, dar în schimb produc ARN și proteine necesare funcționării sistemului nervos, care subordonează și controlează întregul organism. Este clar că există o multitudine de sisteme de reglare ce acționează la diferite niveluri de organizare a materiei vii. De altfel conceptul de „organism“, introdus de biologul francez *Buffon* la începutul secolului trecut, este inspirat de asemănarea pe care filozofii greci o făceau între ființe și societatea omenească. Ambele sînt alcătuite din subunități care interacționează în mod organizat și coordonat.

Actuala concepție despre celulă, ca un sistem care dispune de mecanisme de autoreglare, de interacțiuni cu alte celule sau cu mediul extern, este diferită de cea a citologilor din secolul trecut ce considerau organismul superior ca „un agregat de unități individuale complet independente“. Autonomia celulelor ce compun organismele multicelulare nu este absolută și se poate spune (Diculescu, 1978) că sănătatea organismului depinde în mare măsură de sistemele de comunicație și de mecanismele de coordonare dintre celule.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Benga Gh., *Direcții de dezvoltare a biologiei celulare*, Forum, 26, 57—60, 1984.
2. Botnariuc N., *Conceptia și metoda sistematică în biologia generală*, Editura Academiei R.S.R., 1976.
3. Diculescu I., în „*Filozofie și medicină*“ (sub redacția Fl. Georgescu), Editura Medicală, București, 1978.
4. Soran V., în „*Sisteme în științele naturii*“ (sub red. M. Malița), Editura Academiei R.S.R., 1979.

2. NOȚIUNI GENERALE DESPRE CELULE

2.1. CELULE PROCARIOTE ȘI EUCARIOTE

Biologia celulară se ocupă cu trăsăturile comune ale celulei, ca numitor comun al viețuitoarelor. Nu trebuie însă pierdut din vedere faptul că celulele îndeplinesc roluri specializate, existând prin urmare o mare diversitate de celule.

De la început este necesar să facem distincția între celulele procariote și eucariote, între care există deosebiri esențiale în privința planului de organizare.

Diferențierea celor două tipuri celulare are implicații serioase în clasificarea organismelor vii. Din *procariote* fac parte *bacteriile* și *algele albastre-verzi* (numite și *cianobacterii*), iar din *eucariote* fac parte *plantelor* și *animalele*. Eucariotele pot fi unicelulare (cum sînt *protozoarele*) sau pluricelulare (animale *metazoare* sau plante *metafite*), pe cînd procariotele sînt numai unicelulare. Toate organismele unicelulare se numesc *protiste*.

Cîteva deosebiri esențiale între celulele procariote și eucariote (care se deosebesc și prin mărime, primele fiind mai mici, de circa 10 ori în dimensiuni lineare) sînt următoarele:

1. Celulele eucariote au *nucleu* cu o morfologie caracteristică, înconjurat de o membrană proprie, avînd la interior *nucleoli*. Dimpotrivă, la celulele procariote nu putem vorbi de nucleu adevărat, materialul nuclear fiind răspîndit în citoplasmă, formînd așa-numitul *nucleoid* sau *echivalent nuclear*. Acesta este format dintr-o singură moleculă de ADN de formă circulară, care constituie *cromozomul unic al procariotelor* (fig. 2.1.).

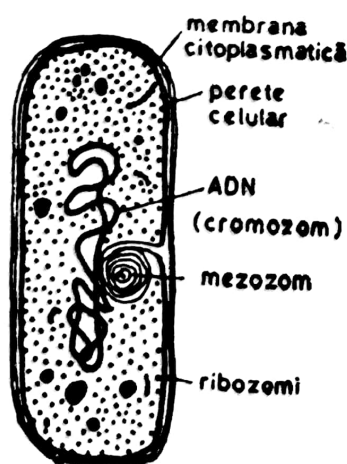


Fig. 2.1. Schema celulei procariote.

2. Eucariotele posedă forme evolute de înmulțire (diviziunea indirectă cu cele două forme: mitoză și meioză). În cursul diviziunii celulare la eucariote materialul nuclear se condensează sub forma *mai multor cromozomi*, al căror număr și structură constituie o caracteristică de specie. Cromozomii eucariotelor sînt alcătuiți din complexe de ADN și proteine (în special histone). Procariotele nu au asemenea forme evolute de înmulțire, ci se multiplică prin sciziparitate sau fisiune binară.

3. Eucariotele posedă în citoplasmă *organite celulare* delimitate de membrane: mitocondrii, cloroplaste, lizozomi, peroxizomi, aparat Golgi,

reticul endoplasmic. Restul citoplasmei formează matricea citoplasmatică numită și *citosol*. Celula eucariotă, delimitată la exterior de membrana plasmatică (plasmalema), prezintă deci o *compartimentare structurală și funcțională* a citoplasmei. Procariotele nu posedă organele celulare și deci nici compartimentarea citoplasmei.

4. Procariotele sînt delimitate la exterior de o membrană plasmatică dar mai au în afara ei și un *perete celular* cu o compoziție chimică caracteristică, cu prezența unui peptido-glican ce conține *a.N-acetil-muramic*. Membrana plasmatică de la procariote poate avea prelungiri la interiorul citoplasmei numite *mezozomi*.

5. Eucariotele posedă în citosol un *citoschelet*, care determină forma celulei și stă la baza mișcărilor celulare, cum sînt, de pildă, curenții citoplasmatici în interiorul celulei sau locomoție prin mișcări ameboidale. Procariotele nu posedă aceste două tipuri de mișcări, locomoția fiind asigurată de flageli simpli, care nu au complexitatea flagelilor de la eucariote. Există și alte deosebiri între procariote și eucariote pe care le vom sublinia în capitolele respective.

O mențiune specială trebuie acordată virusurilor. *Virusurile* se află la limita dintre materia vie și cea ne-vie. Ele se pot defini ca entități biologice cu o structură relativ simplă, formate dintr-un miez de acid nucleic (fie ADN, fie ARN) și un înveliș proteic numit *capsidă*. Virusurile nu sînt celule, fiindcă nu se pot reproduce în afara unei celule gazdă (sînt paraziți intracelulari).

Deși studiul procariotelor se face în special în cadrul microbiologiei și virusologiei, datorită creșterii rapide și a posibilității de manipulare biochimică și genetică a procariotelor, multe din cunoștințele actuale de biologie moleculară au fost obținute pe procariote. Bacteriile joacă la ora actuală un rol esențial în experiențele de recombinare a ADN (inginerie genetică).

2.2. NUMĂRUL, FORMELE ȘI DIMENSIUNILE CELULELOR EUCARIOTE

Numărul celulelor din organismul uman este foarte mare, de circa cîteva milioane de miliarde. Celulele sanguine sînt cele mai numeroase din corpul uman, apar în mai multe zeci de mii de miliarde. Numărul hepatocitelor este de circa 100 miliarde, cel al neuronilor cam la fel, pe cînd nevrogliile sînt de 10 ori mai numeroase.

Diversitatea celulelor se manifestă și prin formele și dimensiunile celulelor (fig. 2.2.). Cu toate că inițial toate celulele sînt rotunde, forma se modifică în cursul diferențierii și maturării celulelor, pentru a fi adaptată cît mai adecvat funcțiilor. *Adaptabilitatea forme la funcție* este o lege generală în biologie. Astfel, celulele contractile sînt fusi-forme, cele cu funcție de conductibilitate au prelungiri etc. Există și celule sferice (ovocitul), discoidale (hematia), cilindrice, cubice, stelate,



Fig. 2.2. Forme și dimensiuni comparative ale celulelor din organismul uman, (mărite de 190 ori)
 1: ovul; 2: spermatozoid; 3: celulă musculară netedă; 4: hematie văzută din față și din profil; 5: trombocite; 6: leucocit mononuclear; 7: celulă osoasă; 8: celulă cartilaginoasă; 9: celulă adipoasă; 10: celule din epiteliul posterior al corneei; 11: hepatocite; 12: fibroblaste (celule conjunctive); 13: celulă mucoasă; 14: celule din epiteliul intestinal; 15: celule ciliate; 16: celule prismatice; 17: celule cubice; 18: celulă Purkinje din cerebel; 19: celule epiteliale turtite; 20: neuron multipolar; 21: neuron unipolar; 22: celulă nervoasă piramidală; 23: fibră musculară striată; 24: celule epiteliale din piele; 25: celule endoteliale; 26: celule turtite suprapuse; 27: neuron bipolar; 28: celulă glandulară; 29: celulă vezicală; 30: celulă din stratul profund al cerebelului; 31: celulă auditivă; 32: celulă din măduva osoasă (după Drăgoiu și Crișan, 1946).

poliedrice, flagelate (spermatozoidul), pavimentoase, bizare (celulele Purkinje din cerebel au numeroase prelungiri).

Dimensiunile celulelor pot fi variate. Majoritatea celulelor omului au diametrul de 20—30 μm (un micron sau micrometru fiind: 1 $\mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}$ sau 1/1000 mm). Există și celule mici de 3—4 μm cum sînt neuronii din scoarța cerebeloasă, de 4—5 μm cum sînt limfocitele, sau mai mari, de 125—150 μm cum sînt neuronii giganți din scoarța frontală (celulele piramidale) și de 250 μm , ovocitele umane. În plus, unele prelungiri ale celulelor nervoase (axonii celulelor piramidale din creier) pot depăși un metru. Gălbenușul ouălor de pasăre este tot o celulă cu dimensiuni de ordinul centimetrilor (10 cm la oul de struț, cea mai mare celulă).

Volumul celular variază foarte mult de la un tip de celulă la altul, fiind cuprins între 300—15.000 μm^3 în țesuturile omului. În general volumul unui anumit tip de celulă este constant indiferent de specie și de mărimea organismului. Astfel, hepatocitul de șoarece, om sau elefant au aceeași mărime. Aceasta este uneori denumită *legea constanței volumului*. Deci mărimea organului nu este determinată de mărimea celulelor ci de numărul celulelor din organ.

2.3. SCHEMA DE ORGANIZARE MORFOLOGICĂ ȘI FUNCȚIONALĂ A CELULEI EUCARIOTE

În general o celulă eucariotă are trei componente: este limitată la exterior de o *membrană plasmatică* (plasmalema), iar la interior are *nucleul*, între nucleu și plasmalemă fiind *citoplasma*. Uneori se folosește

în mod greșit în loc de citoplasmă termenul vechi de protoplasmă. Protoplasma este întreaga materie vie a celulei, deci cuprinde atât nucleul, cit și citoplasma.

Structura celulei variază foarte mult în funcție de perioadele ciclului celular. În general fiecare celulă are un *ciclu celular*, format din așa-numita *interfază* sau *intercineză* (perioada dintre diviziunile celulare) și din *diviziunea celulară*.

La microscopul optic plasmalema nu este vizibilă. În schimb se poate observa nucleul, având la interior *nucleolul* și *cromatina* (substanța din care sînt formați cromozomii și care se colorează intens cu coloranții bazici, fiind formată din molecule filamentose de ADN și histone). Cromatina se poate prezenta sub forma unei rețele filamentoase sau ca granule cum este aspectul ei în interfază, sau sub forma tipică a cromozomilor în timpul diviziunii celulare. Citoplasma examinată la microscopul optic apare ca o masă relativ omogenă în care se disting însă numeroase particule și granule, datorită indicilor diferiți de refracție. Acestea corespund fie organitelor celulare (centru celular, mitocondrii, aparat Golgi etc.), fie granulelor de secreție, pigmentilor, picăturilor de lipide etc. Se pot distinge în citoplasmă două zone: una periferică, numită *ectoplasmă*, ce apare mai vîscoasă, opacă, lipsită de organele celulare și zona internă, numită *endoplasmă* (granuloplasmă) ce conține toate organele și granulațiile celulei și este mai luminoasă și mai puțin vîscoasă. Cele două zone, între care nu există o graniță, sînt diferite și din punct de vedere funcțional: ectoplasma participă la fenomenele de suprafață, pe cînd în endoplasmă se desfășoară toate procesele metabolice ale celulei.

Dacă cu ajutorul microscopului optic s-a descris heterogenitatea citoplasmei și s-au observat unele organele celulare, a existat însă mereu suspiciunea că acestea sînt artefacte (modificări datorită tehnicii greșite). *Microscopia electronică* a demonstrat că structurile descrise anterior sînt reale, confirmînd heterogenitatea citoplasmei și în plus a dus la descrierea unor structuri noi în citoplasmă. Pe lîngă aceste succese microscopia electronică a produs și o mare dezamăgire, neputînd aduce criterii certe de diferențiere între o celulă normală și una canceroasă.

La microscopul electronic apare toată complexitatea ultrastructurii celulei eucariote în interfază (fig. 2.3.). Ceea ce frapază este multitudinea de membrane. Pe lîngă *plasmalemă*, care poate prezenta expansiuni (*microvilozități*, *cili*, *flageli* sau dispozitive de fixare intercelulară — *desmozomi* și alte *jonțiuni*) — se disting membrane intracelulare. Astfel, *nucleul* apare înconjurat de o membrană dublă prevăzută cu pori, membrana externă continuîndu-se cu o rețea de canale și cavități ce formează *reticulul endoplasmic*, un adevărat sistem vacuolar. Acesta poate fi de tip *rugos* (avînd atașați *ribozomi*) sau *neted* (fără ribozomi). Din reticulul endoplasmic se desprind vezicule ce fuzionează cu sacii *aparaturii Golgi*, din care se desprind apoi *vezicule de secreție*, ce-și varsă conținutul la exterior după fuzionare cu plasmalema, proces numit *exocitoză*. Dimpotrivă, din plasmalema se formează vezicule de *endocitoză*, prin care pătrund substanțe de la exterior în citoplasmă. Există deci un sistem complex de membrane intracitoplasmice interconectate.

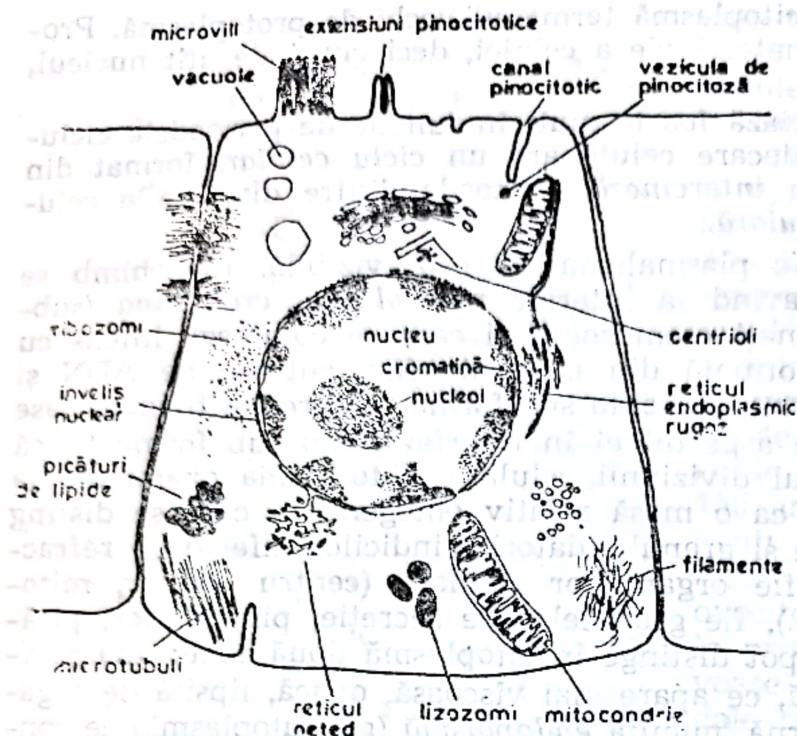


Fig. 2.3. Schema structurii celulei eucariote animale examinată la microscopul electronic (după Loewy și Siekevitz, 1969).

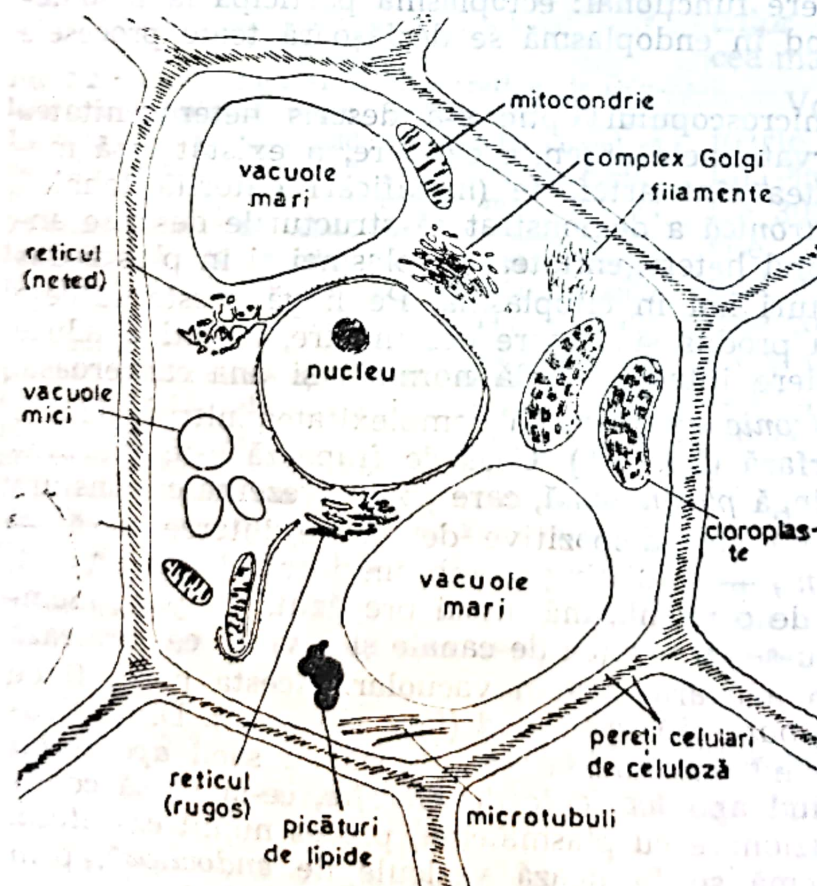


Fig. 2.4. Schema structurii celulei eucariote vegetale examinată la microscopul electronic (după Loewy și Siekevitz, 1969).

În citoplasmă se mai disting și alte organele celulare: *mitocondriile* (avînd o membrană dublă cu creste la interior), *lizozomii* și *peroxizomii* (ambele clase de organele fiind înconjurate de o membrană simplă), *centriolii* (implicați în diviziunea celulară). De asemenea în citosol sau *matricea citoplasmatică*, aflată în afara organelor și membranelor intracitoplasmice, se mai disting *ribozomi* neatașați reticulului endoplasmic, granule de glicogen, picături de lipide și diferențierile citoplasmice ale *citoscheletului* (filamente și microtubuli).

Celulele vegetale (fig. 2.4.) au la exterior un perete celular format din polizaharide, iar la interior, pe lângă *vacuole* mari prezintă organele caracteristice numite *cloroplaste*, cu rol în fotosinteză, ce nu apar în celulele animale.

Există o *specializare funcțională* a componentelor celulei eucariote. *Plasmalema* conferă individualitatea celulei, reglează schimburile celulei cu exteriorul și asigură interacțiunile cu alte celule. Nucleul este centrul genetic și regulator al tuturor proceselor celulare, este deci „tezaurul” de informații, dar și „centrala cibernetică” a celulei. *Nucleolul* are rolul de a

sintetiza ARN și de a forma *ribozomii*, „uzinele“ în care celula își produce proteinele. Aceste „uzine“ sînt organizate în „platforme industriale“ în *reticulul endoplasmic rugos*, care prin ribozomii atașați are rol principal în sinteza proteinelor secretate de celulă și a proteinelor ce intră în compoziția membranelor celulare (pe cînd proteinele solubile din citosol sînt sintetizate în ribozomi liberi, neatașați reticulului). *Reticulul endoplasmic neted* este specializat în metabolismul lipidic, iar în hepatocit și în procesele de detoxificare poate fi deci comparat cu un „combinat chimic“ special aflat în celulă. *Aparatul Golgi* are rolul principal în dirijarea spre plasmalemă a veziculelor ce înglobează proteinele sintetizate în reticulul endoplasmic rugos, după ce le sortează, le modifică conținutul și le „reambalează pentru export“; de asemenea dirijează și traficul de macromolecule spre destinații intracelulare; totodată aparatul Golgi dirijează și fluxul invers de vezicule, de la plasmalemă spre reticulul endoplasmic (reciclarea membranelor) putînd fi astfel comparat cu un „agent de circulație“ al celulei sau o „companie de transporturi“. *Lizozomii*, desprinși din sacii aparatului Golgi, conțin enzime hidrolitice care digeră materialele pătrunse de la exterior sau părți din citoplasmă, deci reprezintă „stomacul celulei“. *Peroxisomii* conțin enzime oxidative ce descompun sau generează apă oxigenată. *Citosolul* conține „în suspensie“ toate organele celulare și, prin diferențierile citoplasmice care formează citoscheletul, joacă rol în menținerea formei celulei și în mișcările celulare; de asemenea citosolul oferă „spațiul“ pentru desfășurarea unor căi metabolice (glicoliza, glicogenoliza, glicogenogeneza etc.), ca și pentru depozitarea unor materiale de rezervă (glicogen, lipide, ioni), sau acumularea de pigmenți. Energia necesară desfășurării tuturor proceselor celulare provine din desfacerea legăturilor macroergice, prototipul de substanță cu asemenea legătură fiind acidul adenozintrifosforic (ATP). Marea majoritate a ATP-ului este sintetizat în celulele animale și umane de către *mitocondrii*, prin procesul de fosforilare oxidativă, mitocondriile fiind astfel „centralele energetice“ ale celulei.

De remarcat că sistemul de membrane interne realizat de organele celulare reprezintă o necesitate pentru celula eucariotă. O celulă eucariotă tipică este de 10 ori mai mare în dimensiuni lineare ca o bacterie tipică (*E. coli*). Aceasta înseamnă că față de volumul celulei eucariote suprafața oferită de plasmalemă este insuficientă pentru a găzdui toate moleculele enzimelor de membrană care îndeplinesc multitudinea de funcții schițate mai sus. În principiu creșterea suprafeței membranelor celulare la eucariote ar putea fi realizată și prin simple invaginări sau expansiuni ale plasmalemei. Dar membranele organelor celulare au compoziție chimică diferită de a plasmalemei și caracteristică fiecărei categorii de organe. Astfel se realizează nu numai suprafața mare necesară găzduirii enzimelor, ci și delimitarea compartimentelor specializate în efectuarea diferitelor funcții. Fiecare compartiment reprezentat de un tip de organit celular poate fi comparat cu un „vas de reacție“ separat, în care se petrec numai anumite reacții chimice, datorită enzimelor concentrate în „reactor“ și menținute acolo datorită membranei organitului respectiv (Alberts și colab. 1983). În acest fel se pot efectua simultan

reacții chimice chiar când sînt incompatibile și se previne interferența unora din reacții cu altele.

Volumele ocupate de principalele compartimente celulare într-o celulă eucariotă tipică sînt redată în Tabelul nr. 2.1. Se observă că majoritatea volumului revine citosolului, urmat de mitocondrii și reticulul endoplasmic.

Suprafața membranelor ce delimitează organitele celulare este mult mai mare decît suprafața plasmalemei, pe primul loc situîndu-se membrana reticulului endoplasmic rugos (Tabel nr. 2.2), urmată de membrana internă a mitocondriilor, sediul fosforilării oxidative, principala sursă de ATP a celulei.

Tabel nr. 2.1. Volumele relative ocupate de principalele compartimente intracelulare în hepatocit

(după Alberts și colab., 1983)

Compartimentul intracelular	Procentul din totalul volumului celular	Numărul de exemplare din celulă
Citosolul	54	1
Mitocondriile	22	1.700
Reticulul endoplasmic rugos	9	1
Reticulul endoplasmic neted	6	
pluș aparatul Golgi	6	1
Nucleul	1	400
Peroxisomii	1	300
Lizozomii		

Tabel nr. 2.2. Proporția diferitelor membrane intracelulare

(după Alberts și colab., 1983)

Tipul de membrană	Procentul din totalul membranelor celulare	
	Hepatocit	Celula pancreatică exocrină
Plasmalema	2	5
Membrana RE rugos	35	60
Membrana RE neted	16	1
Membrana aparatului Golgi	7	10
Mitocondrii:		
Membrana externă	7	4
Membrana internă	32	17
Membrana nucleară internă	0,2	0,7
Membrana lizozomilor	0,4	—
Membrana peroxizomilor	0,4	—
Membrana granulelor secretorii	—	3

Cele două celule au volume diferite: $5000 \mu\text{m}^3$ pentru hepatocit și $1000 \mu\text{m}^3$ pentru celula pancreatică. Aria tuturor membranelor celulare este, respectiv, $110.000 \mu\text{m}^2$ și $13.000 \mu\text{m}^2$.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVA

1. Fraenkel-Conrat H., *Design and Function at the Threshold of Life: the Viruses*, Academic Press, New York—London, 1962.
2. Hood L. E., Wilson J. H., Wood W. B., *Molecular Biology of Eucaryotic Cells*, W. A. Benjamin, Menlo Park, 1975.
3. Ionescu-Varo M., *Biologie Celulară*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1976.
4. Loewy A. G., Siekevitz P., *Cell Structure and Function*, Holit, Rinehart, Winston, New York, 1969.
5. Raicu P., Ionescu-Varo M., Stoian V., *Celula vie*, Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1978.
6. Stares J., *Cell Form and Function*, Geoffrey Chapman, London, 1972.

3. BAZELE MOLECULARE ALE ORGANIZĂRII CHIMICE A CELULEI

3.1. COMPOZIȚIA ELEMENTARĂ A MATERIEI VIE

Există o diferență între abundența *elementelor* chimice în scoarța Pământului și în celule. În scoarța predomină elementele grele (Si, Al), în schimb în organisme predomină elementele ușoare. Este interesant că materia vie se aseamănă din acest punct de vedere cu cosmosul în ansamblu, deoarece stelele și spațiile interstelare sînt alcătuite din elemente ușoare (fig. 3.1.). Există însă o excepție: heliul, foarte abundent în cosmos, nu se găsește în organisme. Elementele grele nu sînt adecvate vieții, datorită insolubilității lor în soluții apoase la pH-ul fiziologic. Pe de altă parte, absența gazelor nobile din materia vie se poate lega de inerția lor chimică foarte mare.

Din totalul elementelor chimice au fost identificate în celule circa 60, dar numai 20 au fost demonstrate ca fiind esențiale pentru viață. Ele se pot împărți, după abundența lor în celule, în trei categorii (Tabel 3.1): a) *elemente majore* (formînd 2—60% din totalul compoziției celulei): O, C, H, N; b) *elemente puțin abundente* (0,02—0,1%): P, S, Cl, Na, K, Ca, Mg. Aceste 11 elemente mai sînt numite *plastice*, deoarece toate joacă un rol important în alcătuirea structurilor celulare; c) *oligoelemente* (sub 0,02%), avînd în

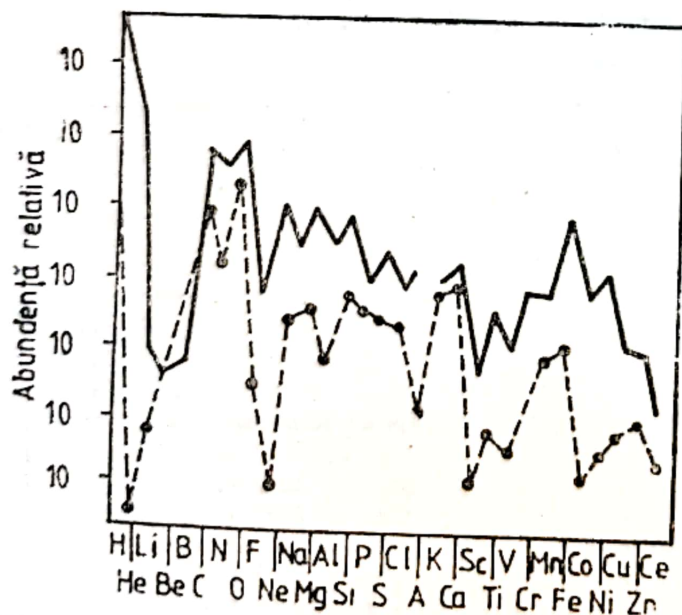


Fig. 3.1. Abundența relativă a primelor 31 elemente din tabelul periodic în cosmos (—, per 100 atomi de Si) și în organisme vii (... , per 100 atomi de C) (după Loewy și Siekevitz, 1969).

special un rol catalitic, adică influențînd activitatea enzimelor. Studiul oligoelementelor este în actualitate, deoarece absența lor în unele zone geografice din sol și apă produce boli la plante și animale sau chiar la oameni, mai ales în regiunile subdezvoltate (endemii biogeochimice). Pe de altă parte, se acordă în prezent o mare atenție oligoelementelor ca factori favorizanți în producerea unor boli cu răspîndire în masă, sau dimpotrivă, în prevenirea unor asemenea boli (de exemplu seleniul în cancer).

Trebuie subliniată poziția centrală a carbonului în materia vie. Cu excepția apei, ma-

joritatea moleculelor din celulă au la bază un schelet de carbon de care se leagă apoi alți atomi. O proprietate importantă a carbonului este aceea de a se lega cu alți atomi de carbon formând lanțuri lungi și variate sau cicluri. Tetravalența carbonului permite formarea unor structuri tridimensionale. În sfârșit, atomii de carbon pot forma legături duble sau triple, cu consecințe mari asupra reactivității moleculelor respective. Siliciul, care și el poate forma lanțuri, nu poate forma legături multiple. De aceea este puțin probabil ca viața extraterestră (posibilă în principiu) să aibă la bază siliciul.

Tabel 3.1. Elementele chimice din materia vie și câteva din funcțiile lor

Categoria	Elementul	Simbol	Nr. atomic	FUNCȚII
Elemente majore, abundente (2–60%)	Oxygen	O	8	Intră în compoziția substanțelor organice din celulă
	Carbon	C	6	
	Hidrogen	H	1	
	Azot	N	7	
Elemente puțin abundente (0,02–0,1%)	Fosfor	P	15	Intră în compoziția acizilor nucleici, a nucleotidelor, a fosfolipidelor, a proteinelor; fosfat de Ca în os
	Sulf	S	16	Intră în compoziția proteinelor; ionul (SO_4^{2-})
	Clor	Cl	17	Anion major extracelular (Cl^-)
	Sodiu	Na	11	Cation major extracelular (Na^+)
	Potasiu	K	19	Cation major intracelular (K^+)
	Calciu	Ca	20	Fosfat de Ca în os.
	Magneziu	Mg	12	Cation extracelular (Ca^{2+}) influențează excitabilitatea neuromusculară, coagularea sîngelui, activator al enzimelor: lipaza, fosfataza alcalină, colinesteraza, ATPaza.
				Cation major intracelular (Mg^{2+}) influențează excitabilitatea neuromusculară, permeabilitatea membranelor, activator al enzimelor: ATPazele, enzimele de fosforilare
Oligoelemente (sub 0,02)	fier	Fe	26	Constituent al hemoglobinei și al enzimelor de oxido-reducere
	Cupru	Cu	29	Necesar pentru utilizarea Fe în hematopoeză; activator al unor enzime de oxido-reducere, asigură transportul O_2 la multe animale marine
	Cobalt	Co	27	Intră în vitamina B_{12}
	Mangan	Mn	25	Activator al unor enzime
	Zinc	Zn	30	Activează sau intră în structura unor hormoni (insulina) și a unor enzime: anhidraza carbonică, carboxipeptidaza
	Iod	I	53	Constituent al hormonilor tiroidieni
	Molibden	Mo	42	Cofactor al unor enzime
	Fluor	F	9	Intră în compoziția osului și a dentinei
	Bor	B	5	Cofactor al unor enzime la plante
	Vanadiu	V	23	Cofactor al unor enzime
	Siliciu	Si	14	Element de constituție

3.2. SUBSTANȚELE CHIMICE DIN CELULĂ

Substanțele chimice din celule se împart în *substanțe anorganice* (apa și sărurile minerale) și *substanțe organice* (proteine, glucide, lipide, acizi nucleici etc.). Proporția în care apar acești constituenți chimici în diferite tipuri de celule variază cu specia, tipul celulelor, starea lor funcțională, vârsta organismului etc.

Totuși se poate face următoarea generalizare: toate ființele vii sînt compuse din același tip de substanțe chimice și majoritatea organismelor le conțin în proporții similare. Acesta este un aspect al unității materiale a lumii vii. Exprimînd în procente valorile la scara întregului organism, acestea nu diferă mult de la bacterii (*E. coli*) pînă la om: apă (70%), proteine (15%), acizi nucleici (7%), glucide și metaboliții lor (3%), lipide și metaboliții lor (2%), ioni anorganici (1%), aminoacizi liberi și metaboliții lor (0,8%), nucleotide libere și metaboliții lor (0,8%), alte molecule organice cum sînt vitaminele și peptidele mici (0,4%). La scară celulară însă, există diferențe considerabile între *E. coli* și hepatocitul uman sau între acesta și o celulă nervoasă etc. Trebuie să facem distincția între organismul intact și celula individuală.

3.2.1. SUBSTANȚELE ANORGANICE

a. Apa

Este o componentă esențială, fiind mediul de dispersie al materiei vii, adică mediul în care se desfășoară toate fenomenele fizico-chimice ale vieții. Celulele conțin 60—95% apă, cantitatea fiind variabilă în funcție de activitatea și vârsta celulei, cele tinere fiind mai bogate în apă. Acest procentaj reprezintă 99% din totalul moleculelor celulei. Un adult de 70 kg conține peste 40 kg apă.

Apa posedă unele proprietăți fizico-chimice unice, care îi permit să-și îndeplinească funcțiile atît de importante în organisme.

1. Apa este o *moleculă polară*; caracterul de dipol se datorește aranjării O și H în triunghi isoscel, existînd un pol pozitiv reprezentat de cei doi atomi de hidrogen și un pol negativ, reprezentat de oxigen, cu o dispoziție tetraedrică a sarcinilor pozitive și negative (fig. 3.2.). În consecință, apa are o constantă dielectrică mare, atenuînd foarte mult atracția dintre sarcinile pozitive și negative (efect de ecranare). Tot datorită caracterului dipolar al apei, moleculele sale se orientează în jurul moleculelor dipolare dizolvîndu-le, iar substanțele cu legături ionice disociază electrolitic, moleculele de apă formînd învelișul de hidratare al ionilor. Apa este deci un solvent excelent al multor substanțe din organisme, atît compuși organici, cît și săruri minerale.

2. Apa disociază ea însăși în ioni de oxidril (OH^-) și protoni (de fapt ioni de hidroniu, H_3O^+), ceea ce influențează reacțiile din celule.

3. Moleculele de apă se leagă între ele prin legături de hidrogen (fig. 3.2) într-o aranjare tetraedrică, care se întâlnește în gheață pe întreg cristalul (fig. 3.3.) sau pe domenii limitate și pe durată foarte scurtă și în apa lichidă. Legăturile de hidrogen conferă apei: a) o valoare foarte mare a capacității calorice, ce realizează o „ecranare termică“, apărând structurile celulare de distrugeri termice la eliberări bruște de căldură în reacțiile exotermice; la aceasta mai contribuie și conductibilitatea termică a apei, mai ridicată decât a altor lichide; b) căldură mare de vaporizare permițând reglarea temperaturii corpului prin evaporare.

Apa nu este deci un simplu mediu de dispersie în celulă, ci influențează profund moleculele pe care le dispersează, prin proprietățile amintite mai sus, care intervin toate simultan, făcând apa solventul unic al lumii vii. Dacă un sistem viu ar fi bazat pe medii neapoase (de pildă alcool etilic) ar trebui să existe o nouă chimie a vieții, bazată pe reacții în medii neapoase.

Fazele apoasă și neapoasă din celulă. Trebuie remarcat că există în celulă o fază apoasă și o fază neapoasă. Dacă toate componentele din

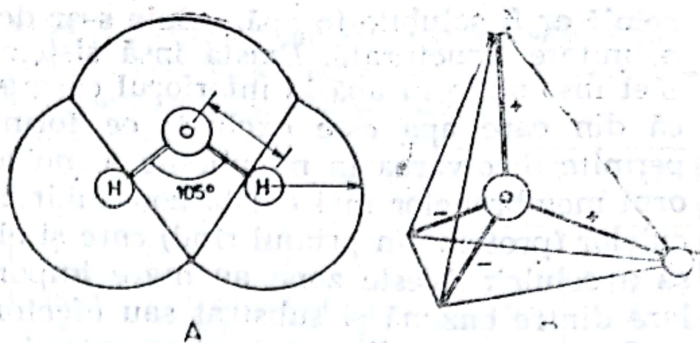
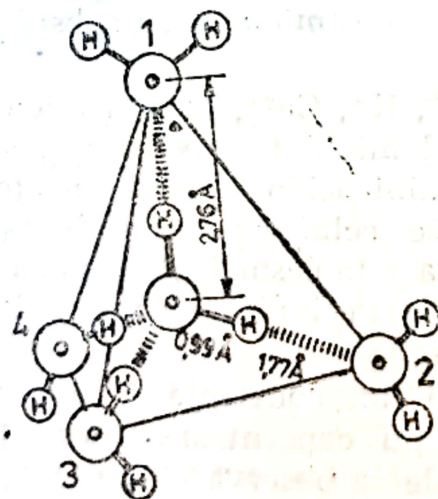
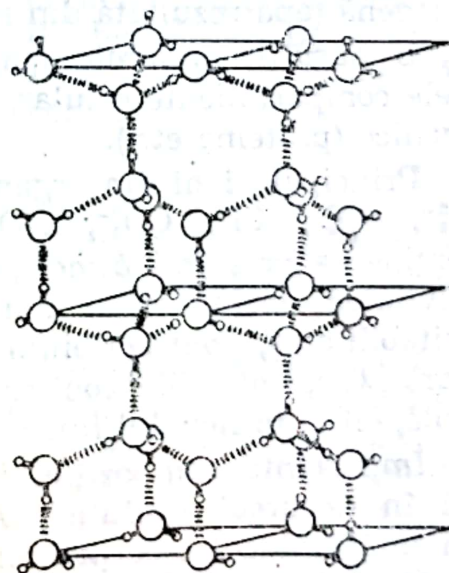


Fig. 3.2. Structura apei.

A. Distanțele și unghiurile legăturilor din molecula de apă. B. Caracterul dipolar al moleculei de apă: datorită forței puternice de atracție exercitată de către atomul de oxigen asupra celor 4 electroni exteriori neîmperecheați se produce separarea sarcinilor pozitive și a celor negative după direcția vîrfurilor unui tetraedru. Consecința pentru structura gheții se vede în fig. 3.3 A și 3.3B.



A



B

Fig. 3.3.A. Coordonarea tetraedrică a moleculelor de apă în gheață. Moleculele 1 și 2, ca și molecula centrală, se află în planul hîrtiei. Molecula 3 se află deasupra planului, iar molecula 4 dedesubtul planului, astfel că atomii de oxigen 1—4 se află la colțurile unui tetraedru regulat. B. Aranjamentul moleculelor de apă în gheață.

celulă ar fi solubile în apă, celula s-ar dezmembra și ar înceta să mai fie o unitate structurată. Există însă sistemul de membrane celulare complet insolubile în apă la interiorul cărora există un mediu hidrofob (adică din care apa este exclusă) ce formează o fază neapoasă. Aceasta permite dizolvarea în membrane a moleculelor lipofile. Pe lângă interiorul membranelor mai există zone hidrofobe și în interiorul macromoleculelor (proteine în primul rând) care și ele fac parte tot din faza neapoasă a celulei. Aceste zone au mare importanță în interacțiunile moleculare dintre enzimă și substrat sau efectorii alosterici, interacțiunile dintre hormoni și medicamente și receptorii specifici etc.

În faza apoasă a celulei distingem, pe de o parte, *apa liberă* (95% din totalul apei celulare), care joacă rolul de dizolvant mediu de dispersie și este sediul proceselor metabolice; pe de altă parte, *apa legată* (5%) prin legături de hidrogen și alte forțe de proteine, lipide și alte componente celulare. În apa legată se poate încadra și *apa imobilizată* între fibrele macromoleculelor.

Pe lângă *apa intracelulară* (55% din totalul apei din organism) există și *apa extracelulară* (45% din total): în plasmă, limfă, lichid interstițial (în afara patului vascular și a membranelor plasmactice), secreții digestive, lichid cefalorahidian și în cavitățile seroase. Plasma împreună cu lichidul interstițial formează mediul intern al organismului, care se menține cu o compoziție constantă, concept fundamentat de *Claude Bernard* și dezvoltat de *W. B. Cannon*, care a introdus noțiunea de *homeostazie* (capacitatea organismelor animale superioare de a se menține cu caracteristicile lor morfologice și funcționale într-un mediu de viață variabil).

Apa din organism are două surse: una exogenă (apa ingerată) și alta endogenă (apa rezultată din reacțiile metabolice).

b. *Sărurile minerale* apar sub formă de *ioni liberi* dizolvați în diferitele compartimente celulare sau sub formă de *combinații* cu substanțele organice (proteine etc.).

Principalii ioni din organisme sînt: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} (cationi) și PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Cl^- , CO_3^{2-} , NO_3^- (anioni). Ionii sînt importanți pentru menținerea presiunii osmotice și a echilibrului acido-bazic, influențează activitatea enzimelor și numeroase procese celulare: permeabilitatea, excitabilitatea, contractibilitatea, vîscozitatea citoplasmei, diviziunea celulară. Concentrațiile ionilor sînt menținute în limite strînse, atît în celulă, cît și în lichidul interstițial și în sînge.

Importanța compoziției ionice reiese și din constanța ei remarcabilă în decursul evoluției. Astfel, comparînd concentrațiile diferiților ioni în lichidul din corpul diferitelor animale se observă (Tabel 3.2.): 1) constanța balanței ionice, adică proporția ionilor este aceeași la toate speciile și este apropiată de cea din apa de mare; 2) există o scădere treptată a concentrațiilor absolute ale ionilor în cursul evoluției, în special a Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} ; 3) scăderea concentrației relative a Ca^{2+} și a SO_4^{2-} .

Tabel 3.2. Compoziția ionică a apei de mare și a lichidelor din corpul diferitelor specii animale (concentrații relative considerind Na^+ ca 100; în paranteze sînt date concentrațiile absolute exprimate în mM) după Loewy și Sikevitz (1969)

	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Cl^-	SO_4^{2-}
<i>Vertebrate</i>						
Om	100 (145)	3,5 (5,1)	1,7 (1,2)	0,83 (1,2)	71 (103)	1,7 (2,5)
Șobolan	100 (145)	4,2 (6,2)	2,1 (3,1)	1,1 (1,6)	80 (116)	
Broască	100 (103)	2,4 (2,5)	1,9 (2,0)	1,2 (1,2)	72 (74)	
Pești (Lophius)	100 (228)	2,8 (6,4)	1,0 (2,3)	1,6 (3,7)	72 (164)	
<i>Nevertebrate</i>						
Insecte (Hydrophilus)	100 (119)	11 (13)	0,93 (1,1)	17 (20)	34 (40)	0,13 (0,14)
Artropode (Lobster)	100 (465)	1,9 (8,6)	2,3 (10,5)	1,0 (4,8)	110 (498)	2,2 (10)
Moluste (Venus)	100 (438)	1,7 (7,4)	2,2 (9,5)	5,7 (25)	120 (514)	5,9 (26)
Echinoderme (Castravete de mare)	100 (420)	2,3 (9,7)	2,2 (9,3)	12 (50)	120 (487)	7,2 (30)
Apă de mare	100 (417)	2,2 (9,1)	2,3 (9,4)	12 (50)	120 (483)	7,2 (30)

3.2.2. SUBSTANȚELE ORGANICE

Structura și proprietățile substanțelor organice, atât micromoleculare, cît și macromoleculare, sînt studiate de biochimie. De aceea ne mărginim la expunerea unor noțiuni privind localizarea lor în celulă și relația dintre structură și funcție la nivel molecular.

a. Glucidele

Dintre monozaharide glucoza este folosită drept „combustibil” pentru obținerea energiei. Pentozele (riboza și dezoxiriboza) intră în structura acizilor nucleici.

Există cîteva particularități ale moleculei de glucoză care fac avantajoasă utilizarea ei ca o substanță cheie în metabolismul celulei: conține în legăturile sale chimice o cantitate substanțială de energie, este ușor susceptibilă degradării pe cale oxidativă pentru eliberarea energiei și este solubilă în apă. Trebuie observat că glucoza este o hexoză, în consecință este mai stabilă decît pentozele și mai reactivă decît monozaharidele cu mai mult de 6 atomi de carbon. Chiar dintre hexoze D-glucoza este cea mai stabilă moleculă, ceea ce reiese din examinarea atentă a structurii spațiale (fig. 3.4.): sub forma ciclică (piranozică) toate grupările de atomi voluminoase (OH , CH_2OH) au poziția ecuatorială, deci la distanță unele de altele; în poziție axială grupările s-ar respinge și stabilitatea moleculei ar scădea.

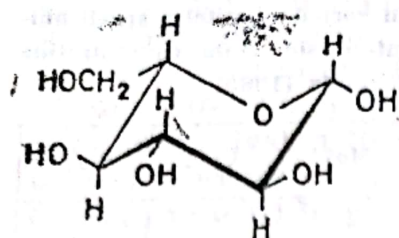


Fig. 3.4. Structura tridimensională a glucozei (D-glucopiranoza) (după Green și Goldberger, 1967).

Glucoza nu se depozitează în celule ca atare, ci sub formă de *polizaharide*: glicogen în celulele animale și amidon în cele vegetale. Și molecula de glicogen are particularități adecvate funcției sale. Glicogenul este format din lanțuri de glucoză legate prin legături α , 1:4 glicozidice care prezintă ramificații (prin legăturile α , 1:6 glicozidice) tot la 6 resturi de glucoză (fig. 3.5). Structura moleculei de glicogen corespunde perfect funcției de depozitare a glucozei. Fiind o macromoleculă nu poate difuza prin membrana celulară. Stocarea

multor molecule de glucoză într-o singură macromoleculă înlătură problema unei presiuni osmotice mari ce ar corespunde aceluiași număr de molecule libere de glucoză. În sfârșit, stocarea unităților de glucoză în molecula foarte ramificată a glicogenului permite enzimelor ce desfac glucoza din glicogen (în glicogenoliză), sau celor ce depozitează glucoza în glicogen (în glicogenogeneză) să acționeze simultan la toate capetele

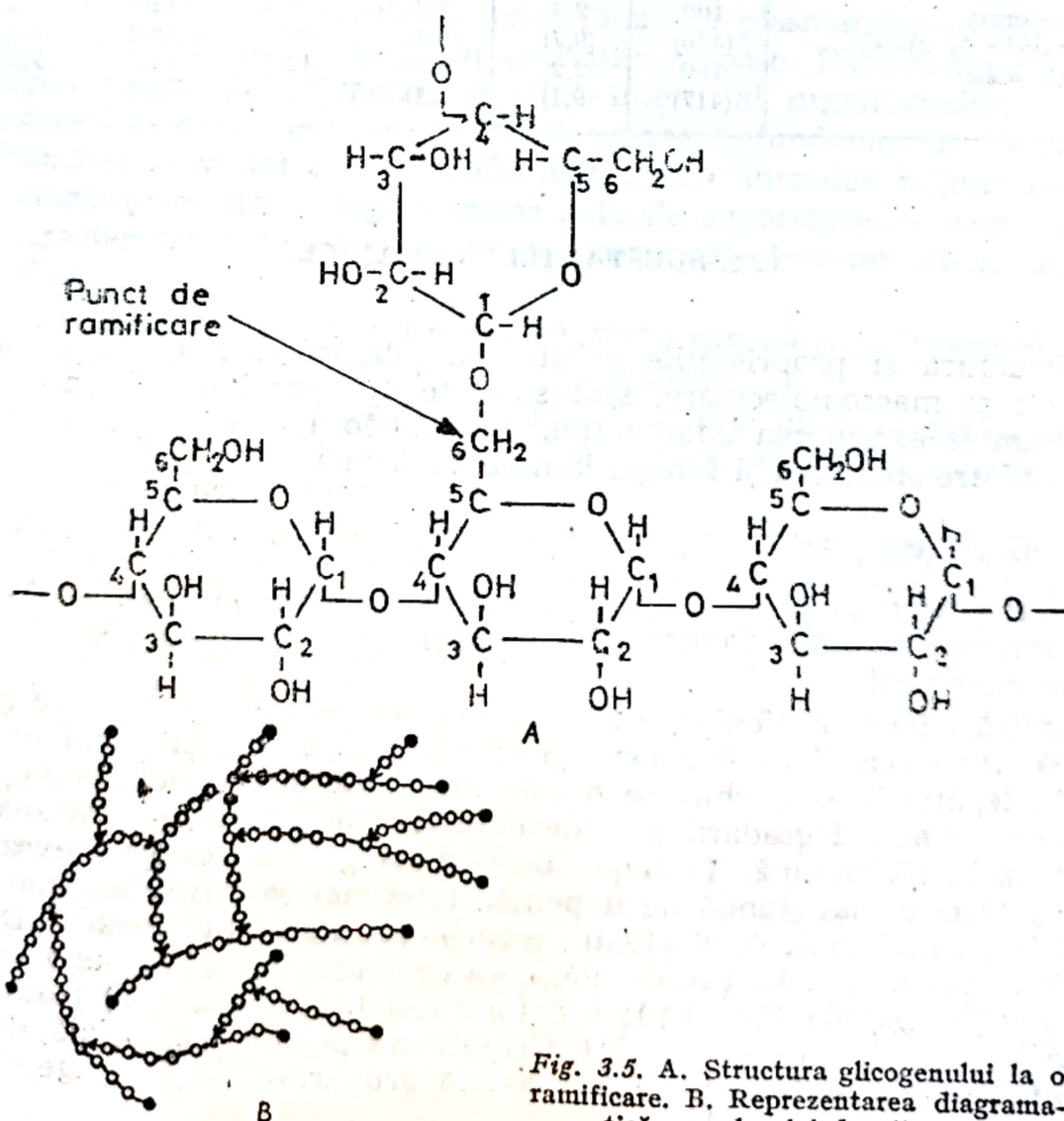


Fig. 3.5. A. Structura glicogenului la o ramificare. B. Reprezentarea diagramatică a moleculei de glicogen.

ramificațiilor. În acest fel se poate menține constantă concentrația de glucoză liberă, eliberându-se rapid unitățile de glucoză la scăderea concentrației sau adăugându-se unități de glicogen în cazul creșterii concentrației glucozei libere.

Glicogenul se prezintă în citoplasmă sub formă de granule sub 3 aspecte structurale, în funcție de mărime: — granule de ordinul I: cu diametrul de 15 nm ce ar putea corespunde moleculelor de glicogen; — granule de ordinul II: 15—150 nm, care se pot vedea numai la microscopul electronic; — granule de ordinul III: peste 150 nm, sînt vizibile și la microscopul optic prin colorații histochemice cu iod sau cu carmin Best. De remarcat că enzimele ce catalizează sinteza (glicogen sintetaza) și degradarea (glicogen fosforilaza) sînt dispuse într-un strat monomolecular pe suprafața granulelor de glicogen.

Mucopolizaharidele sînt polizaharidele în care unitățile monomer sînt formate din derivați aminați ai monozaharidelor (glucozamină, galactozamină etc.), acid glicuronic; de asemenea derivații monozaharidici pot avea resturi de acid sulfuric esterificate. Mucopolizaharidele pot fi legate de proteine sub forma unor compuși macromoleculari. Aceștia reprezintă componente importante în structurile celulare, dar mai ales în componența substanței fundamentale a țesutului conjunctiv. Ca reprezentanți ai mucopolizaharidelor amintim: a. hialuronic, a. condroitinsulfuric, keratosulfatul, heparina.

Evidențierea mucopolizaharidelor se face prin reacții histochemice: — mucopolizaharidele neutre se colorează prin reacția PAS (deci sînt PAS-pozitive); — mucopolizaharidele acide se evidențiază prin reacția de metacromazie.

Soluțiile apoase ale mucopolizaharidelor sînt gelatinoase, vîscozitatea mare fiind datorită hidratării excesive (fiind polianioni) și legăturilor de hidrogen dintre lanțuri. Prin proprietățile lor mucopolizaharidele îndeplinesc o funcție mecanică (susținere, absorbția șocurilor, lubrefiere), dar intervin și activ în metabolismul țesuturilor.

b. Lipidele

Îndeplinesc în celulă 3 roluri: — sursă energetică importantă, reprezentînd „combustibilul” cu valoarea energetică cea mai ridicată; — rol plastic, intrînd în alcătuirea tuturor membranelor celulare; — rol reglator ca vitamine, hormoni steroizi, prostaglandine.

Dintre *lipidele simple*, acizii grași liberi apar în concentrație mică în celule, intrînd în căile de metabolizare: betaoxidarea pentru eliberarea energiei, biosinteza trigliceridelor, forma de depozitare a lipidelor în celulă, sau biosinteza *lipidelor complexe* (fosfolipide, glicolipide).

Este interesant de remarcat că acizii grași sînt utilizați ca sursă de energie în celule și nu alcoolii sau aminele corespunzătoare. Acizii grași oferă avantajul unei solubilități mai mari în apă și a unei reactivități mai mari decît alcoolii sau aminele. În plus, acizii grași utilizați drept „combustibil” în celulă au 16 sau 18 atomi de carbon. Cei cu mai mult de 18 atomi sînt prea insolubili în apă și deci nu ar putea fi utilizați în celulă, pe cînd cei cu mai puțin de 16 atomi sînt prea solubili în apă și distrug membranele celulare.

Lipidele complexe (fosfolipide și glicolipide) sînt componente importante în structura membranelor celulare. Structura lor corespunde perfect funcției. Aceste molecule au molecula amfifilă (amfipatică), adică prezintă un „cap” hidofil (gruparea polară) și o „coadă” hidrofobă (cele două resturi de acizi grași esterificate pe scheletul glicerinei). În apă aceste molecule amfifile se asociază formînd micle (fig. 3.6.) deoarece radicalii de hidrocarbură trebuie ținuti în afara contactului cu apa. Forma cea mai stabilă a micelilor în cazul fosfolipidelor și glicolipidelor este cea a unui strat dublu lipidic în care grupările polare sînt la exterior în contact cu apa, iar lanțurile de acizi grași se află la interior. Această structură stabilă se întîlnește și în membranele celulare. Stratul dublu lipidic este mai mult decît o colecție de molecule separate; interacțiunile cooperative dintre lanțurile vecine de acizi grași fac miclela similară unei macromolecule.

Posibilitățile de variație în structura fosfolipidelor: natura grupării polare, numărul de atomi de carbon și de legături duble din lanțurile acizilor grași aduc modificări importante în organizarea moleculară a stratului dublu lipidic.

În celulă se pot evidenția **lipidele de rezervă** (trigliceride) sub forma unor picături în citosol, prin colorații speciale cu Sudan III (apar galbene-portocalii) sau cu Sudan negru (apar negre).

În multe celule picăturile se unesc formînd picături mari (cu diametrul de 0,2—5 μm). Acestea servesc drept depozit de energie. În adipocite, celulele specializate în depozitarea grăsimii, picăturile pot avea pînă la 80 μm , ocupînd practic întreg citosolul. Nucleul este împins la periferie, rezultînd aspectul de „inel cu pecete”.

c. Proteinele

Apar în celule într-o varietate foarte mare, atît ca număr, cît și ca specii chimice. Proteinele joacă un rol crucial în organism fiind reglatorii tuturor activităților celulelor. Astfel, enzimele (catalizatorii reacțiilor

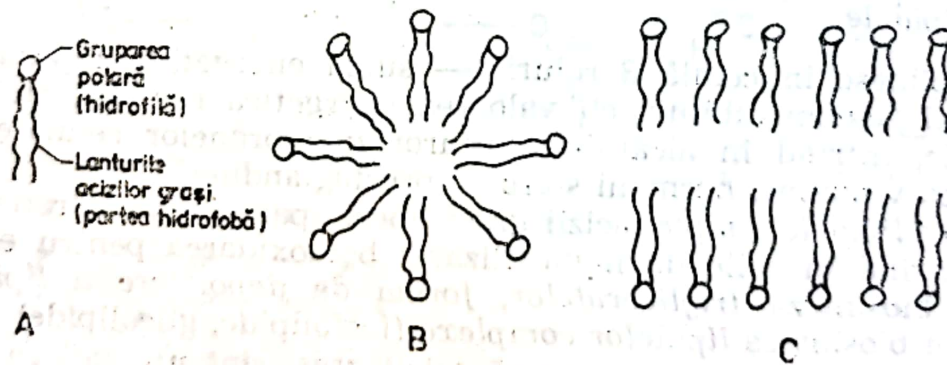


Fig. 3.6. A. Reprezentarea diagramatică a unei molecule lipidice amfifile. Partea hidrofilă este reprezentată de gruparea polară în fosfolipide, de gruparea OH de la C₃ în colesterol și resturile glucidice în glicolipide. Partea hidrofobă este formată din lanțurile de acizi grași în fosfolipide, lanțul de acid gras și lanțul de hidrocarbură al sfingozinei în sfingomielină și glicolipide și de întreaga moleculă cu excepția grupării OH în colesterol (formulele lipidelor complexe sînt redată în capitolul „Membranele biologice”). B. Micelă sferică de lipide amfifile. C. Stratul dublu lipidic.

chimice din sistemele biologice) sînt proteine. Tot proteinele sînt implicate în transport și depozitare (transportul prin membranele biologice, transportul oxigenului de către hemoglobină și mioglobină, transportul și depozitarea fierului), motilitate (actina și miozina, microtubulii), protecție imună (anticorpi contra bacteriilor, virusurilor, celulelor străine), generarea și transmiterea influxului nervos (rodopsina, receptorii sinaptici), controlul creșterii și diviziunii celulare (factorul de creștere a nervilor, a multiplicării celulelor — polipeptide numite chalone), menținerea constantă a presiunii osmotice și a pH-ului, nutriție (ovalbumina), controlul proceselor metabolice (hormonii proteici și polipeptidici). De asemenea proteinele au rol plastic, fiind componente de bază ale tuturor structurilor celulare și îndeplinesc funcții de susținere în țesutul conjunctiv (colagenul), pereții vaselor (elastina), membranele biologice (glicoproteinele), piele și păr (keratina).

Îndeplinirea unor funcții atît de variate în organisme este posibilă datorită structurii lor moleculare. Proteinele sînt macromolecule formate din policondensarea aminoacizilor, uniți prin legături peptidice. Au o structură spațială, tridimensională, esențială pentru activitatea lor biologică, structură determinată de secvența aminoacizilor în lanțul polipeptidic. Există 20 de aminoacizi în proteine, care sînt foarte diferiți: unii hidrofobi, alții polari (încărcați pozitiv sau negativ), unii lungi, alții scurți. Posibilitățile de combinare ale celor 20 de aminoacizi în diferite secvențe sînt imense, ceea ce explică varietatea proteinelor din diferitele celule și rolurile lor diferite.

Unele proteine (holoproteinele) conțin în compoziția lor numai aminoacizi. Dintre holoproteine menționăm protaminele și histonele, proteine bazice care intră în structura cromozomilor. Heteroproteinele conțin pe lîngă aminoacizi și o componentă neproteică legată puternic (grupare prostetică în cazul glicoproteinelor și fosfoproteinelor) sau slab (acizi nucleici în nucleoproteine, sau lipide legate sub forma lipoproteinelor în membranele celulare). Prezența grupării neproteice în moleculă aduce și ea posibilități mari de variație a structurii și a funcției. Același efect îl au și asocierea mai multor lanțuri polipeptidice (subunități) în molecula unei proteine sau asocierea moleculelor proteice în complexe multiproteice.

Trebuie subliniat că proteinele pot îndeplini funcții atît de variate datorită *specificității* lor, adică capacității de a distinge între diferitele tipuri de molecule cu care vin în contact pe acelea cu care se pot combina sau asocia specific: enzimele cu substratele, transportorii cu substanțele transportate, anticorpii cu antigenele. Specificitatea proteinelor constituie baza diferențelor între specii și între indivizii aceleiași specii. Specificitatea proteinelor se datorește structurii lor moleculare spațiale. Fiecare interacțiune de tipul menționat mai sus constituie un capitol pasionant de biologie moleculară.

Unele proteine se pot observa în celule după efectuarea de reacții histochemice de evidențiere a unor enzime, urmată de observarea la microscopul optic sau electronic a unei colorații sau a unor granule ce rezultă prin reacție. Recent s-au evidențiat detalii fine (de exemplu proteine în membranele celulare) prin efectuarea unor reacții histochemice specifice pentru grupări SH ori NH_2 din proteine.

d. Acizii nucleici

Aceste macromolecule sînt formate din policondensarea nucleotidelor (formate dintr-o bază purinică sau pirimidinică, o pentoză — riboza în ARN sau dezoxiriboza în ADN — și o moleculă de acid fosforic). Sînt macromoleculele cu dimensiunile cele mai mari cunoscute: în unele microorganisme există o singură moleculă de ADN cu greutatea moleculară (GM) cuprinsă între 10^6 și 10^9 . Datorită grupărilor fosfat acide acizii nucleici sînt legați în celulă de proteine (protamine, histone etc.).

Acizii nucleici îndeplinesc în celulă funcția esențială de stocare și transmitere a informației genetice utilizată pentru biosinteza tuturor proteinelor celulare. Structura moleculară corespunde funcției lor. ARN este format din 4 nucleotide: a. citidilic, a. uridilic, a. adenilic și a. guanilic. ADN este și el format din 4 nucleotide: a. dezoxicitidilic, a. timidilic, a. dezoxiadenilic și a. dezoxiguanilic. Fiind formate din diferite nucleotide există și aici, ca și la proteine, un număr enorm de specii chimice datorită variațiilor în secvența nucleotidelor. Totuși, trebuie remarcat că acizii nucleici sînt molecule lineare, foarte stabile, iar structura lor spațială nu este așa de diversă ca cea a proteinelor. Dimpotrivă, organizarea spațială dublu helicoidală a ADN este un model general de structură întâlnit în majoritatea celulelor. La fel, structura tridimensională a ARN (de pildă tARN) este asemănătoare la multe specii. Elaborarea modelului în dublu helix al moleculei de ADN, de către Watson și Crick în 1953, este un moment crucial în biologie, permițînd explicarea mecanismului prin care informația genetică este conservată prin fenomenul de replicare și transmisă prin intermediul ARN la proteine.

Localizarea în celulă a acizilor nucleici. ADN este localizat în nucleu și în citoplasmă. Localizarea nucleară este dublă: se distinge ADN cromozomial, în structura cromatinei nucleare și a cromozomilor și ADN extracromozomial în nucleol (nucleolo-asociat). În citoplasmă ADN este localizat în mitocondrie, avînd aici o formă circulară, asemănător cu ADN de la procariote și avînd și proprietăți biochimice diferite de cele ale ADN cromozomial.

ARN este de 3 tipuri: — ARN mesager (mARN) ce duce informația genetică de la nucleu la citoplasmă; — ARN de transport (tARN) care activează aminoacizii și îi transportă la ribozomi, sediul biosintezei proteinelor; — ARN ribozomal (rARN) care intră în structura ribozomilor. ARN este localizat în celulă, în nucleu (în nucleol) și în citoplasmă. În citoplasmă există mARN și tARN în faza solubilă a citoplasmei, rARN în ribozomi, precum și molecule de ARN în mitocondrii.

Evidențierea acizilor nucleici în celulă se poate face după fixare cu alcool și colorare dublă cu verde metil și pironină: ARN apare roșu (nucleolul și citoplasma), iar ADN apare verde (cromozomii). ADN se poate colora în roșu-violaceu prin reacția Feulgen. Nu se pot evidenția acizii nucleici din mitocondrii decît cu metode fine biochimice și de microscopie electronică.

3.3. UNITATEA ORGANIZĂRII BIOCHIMICE A CELULEI

Se pot menționa mai multe principii unitare de organizare chimică a celulei:

a. Celulele sînt compuse din aceleași elemente chimice și aceleași tipuri de substanțe chimice, aflate în proporții relativ constante.

b. Compoziția ionică a lichidelor din corpul diferitelor specii animale este constantă.

c. Unitatea schemei de desfășurare a proceselor biochimice din biosferă: căile metabolice de bază din celulă: glicoliza, ciclul citric, oxidarea acizilor grași, biosinteza acizilor grași și a fosfolipidelor, se desfășoară în aceleași etape, catalizate de enzime asemănătoare.

d. Universalitatea unor molecule: D-glucoza, acizii grași cu 16 și 18 atomi de carbon, cei 20 de aminoacizi, sterolii, bazele purinice și piridinice, se întîlnesc în toate celulele. De asemenea cofactori și grupări prostetice ca: NAD, NADP, CoA, coenzima Q, vitaminele, se întîlnesc ubicuitor.

e. ATP este prototipul moleculelor macroergice, „moneda universală” în schimburile energetice din celule. Există trei sisteme de bază pentru generarea ATP, care se desfășoară identic în toate celulele: glicoliza, cuplarea oxidării cu sinteza de ATP în mitocondrii și fotosinteza. Evident, ele apar toate trei la plante, fotosinteza lipsind la animale și la bacterii.

f. Replicarea ADN, biosinteza proteinelor se desfășoară după aceleași mecanisme în celulele tuturor viețuitoarelor.

g. Mecanismele de control al tuturor proceselor celulare sînt de asemenea comune în biosferă.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Brätter P., Schramel P. (eds.), *Trace Element-Analytical Chemistry in Medicine and Biology*, vol. 3, Walter de Gruyter & Co., Berlin—New York, 1984.
2. Butucelea A., *Arhitectura vieții*, Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1977.
3. Green D. E., Goldberger R. F., *Molecular Insights into the Living Process*, Academic Press, New York—London, 1967.
4. Harrison P. M., Hoare R. J., *Metals in Biochemistry*, Chapman and Hall, London—New York, 1980.
5. Ling G. N., *Water and the Living Cell as Seen from the Viewpoint of a New Paradigm*, in: *International Cell Biology 1980—1981*, Springer Verlag, Berlin, 1981, pp. 904—914.

4. MATRICEA CITOPLASMATICA (HIALOPLASMA, SUBSTANȚA FUNDAMENTALĂ A CITOPLASMEI SAU CITOSOLUL)

4.1. DEFINIȚIE, ROLURI ÎN CELULA

Matricea citoplasmatică, hialoplasma, substanța fundamentală a citoplasmei sau citosolul sînt denumirile sinonime date părții citoplasmei necuprinsă în compartimentele mărginite de membranele intracelulare, deci partea aflată în afara organitelor celulare. Matricea citoplasmatică constituie deci adevăratul mediu intern al celulei care găzduiește organele celulare, cu care are relații metabolice complexe. S-a considerat multă vreme că această parte a citoplasmei este nestructuralizată (omogenă), de unde și denumirea de hialoplasma, dar odată cu progresele microscopiei electronice s-au observat în hialoplasma diferențieri citoplasmatică sub formă de *filamente* și *microtubuli*, care alcătuiesc *citoscheletul*. Recent, cu ajutorul microscopiei electronice de voltaj supraînalt (1.000.000 V), Porter și colab. (1978, 1979), au descris în hialoplasma o rețea de *microtrabecule*, ce au diametrul mai mic decît cel al diferențierilor citoplasmatică. În ultimul deceniu cunoașterea acestei părți a citoplasmei a înregistrat succese atît de mari, încît se poate afirma că studiul citosolului și al citoscheletului a devenit unul dintre cele mai dinamice capitole din biologia moleculară a celulei.

Hialoplasma joacă rol esențial în menținerea formei celulei, în adaptarea ei la necesitățile de moment ale celulei și în mișcările celulare, toate acestea în special prin componentele citoscheletului. În al doilea rînd, matricea citoplasmatică este sediul unor procese metabolice de mare importanță: glicoliza, calea pentozo-fosfatică, gluconeogeneza, glicogenoliza și glicogenogeneza, metabolizarea aminoacizilor, biosinteza acizilor grași, a nucleotidelor etc. În al treilea rînd, citosolul este un depozit intracelular pentru glicogen (în ficat și mușchi), lipide (cum este cazul pancreasului exocrin și al corticosuprarenalei), ioni, monomeri ai proteinelor din care sînt alcătuite diferențierile citoplasmatică, pigmenți etc. Tot în citosol se mai găsesc ribozomii liberi (neatașați membranei reticulului endoplasmic), precum și ARN-ul mesager (mARN) și cel de transfer (tARN), deci circa 15% din ARN-ul celulei.

4.2. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICA A CITOPLASMEI

Se afirmă uneori că citoplasma, sau chiar materia vie în general, reprezintă un sistem coloidal. Prin *sistem fizico-chimic* înțelegem un domeniu limitat al lumii înconjurătoare căruia i se aplică legile fizicii.

și chimiei. Sistemul este constituit din componenți chimici și faze. În interiorul unei faze proprietățile fizico-chimice sînt aceleași sau variază continuu de la un punct la altul. Sistemele constituite dintr-o singură fază se numesc *omogene* (monofazice), pe cînd cele ce conțin mai multe faze sînt *eterogene* (polifazice); în acestea din urmă între fazele de contact există zone de discontinuitate, unde proprietățile sistemului variază brusc. La nivelul zonelor de discontinuitate există *suprafețe de separație* între faze denumite și *suprafețe de discontinuitate*. Sistemele coloidale se caracterizează prin suprafețe de separație dintre faze extrem de întinse, care se pot obține prin dispersarea (fărîmîțarea sau mărunțirea) uneia din faze. Astfel se obține un *sistem dispers* în care (pentru cazul cel mai simplu al sistemului bifazic) există o *fază dispersată*, constituită din mici particule, răspîndite în cealaltă fază numită *mediu de dispersie* (Chifu, 1969).

Cerința de bază a formării sistemelor coloidale este insolubilitatea reciprocă a substanțelor ce compun faza dispersată și mediul de dispersie.

În chimia coloidală, o ramură a chimiei fizice, se definesc drept *sisteme coloidale* acele sisteme disperse eterogene în care faza dispersată este constituită din particule cu dimensiuni de 10^{-5} — 10^{-7} cm. Coloizii propriu-ziși sînt anorganici, de pildă „soluțiile” de aur obținute prin tratarea soluțiilor apoase de clorură aurică cu agenți reducători, metodă cunoscută de alchimisti și folosită de *Faraday*. Acesta observă că drumul unui fascicul luminos ce străbate „soluția” de aur este vizibil dacă se privește perpendicular pe direcția fasciculului, la fel cum într-o cameră întunecată se poate observa o rază de lumină sub forma unei dîre în care „joacă” particulele de praf. Acest fenomen nu se produce la soluțiile adevărate (cum este soluția de clorură de sodiu în apă), ci numai la „soluțiile” coloidale (clorura de sodiu în benzen). Descoperit de Faraday și studiat în special de *Tyndall* acest fenomen se datorează faptului că particulele coloidale împrăstie în toate părțile lumina ce cade asupra lor. De aci aspectul tulbure, *opalescent* al sistemelor coloidale. În cazul materiei vii avem de fapt un sistem omogen, *soluții de macromolecule în apă* (moleculele nu au suprafețe de separație propriu-zise). Soluțiile omogene ale macromoleculelor și proprietățile lor sînt studiate de fizico-chimia macromoleculelor, ramură diferită de chimia coloidală, ce rămîne consacrată coloizilor propriu-ziși anorganici (de pildă soluțiile coloidale de aur). Deoarece macromoleculele au dimensiuni de ordinul particulelor coloidale, o serie de fenomene caracteristice sistemelor coloidale se întîlnesc și la soluțiile macromoleculelor: dispersia luminii (fenomenul Faraday—Tyndall) și fenomene cinetice: difuziunea, mișcarea browniană, sedimentarea în cîmp gravitațional și sedimentarea în cîmp centrifugal. De mare importanță pentru citoplasmă sînt însă tranzițiile *sol-gel*, un alt fenomen coloidal pe care îl prezintă soluțiile de macromolecule în apă. Starea de *sol* este caracterizată prin libertatea de mișcare a particulelor fazei disperse una față de cealaltă și fluiditatea sistemului în ansamblu. Starea de *gel* este caracterizată prin legarea particulelor într-o rețea în ochiurile căreia rămîne apa (mediul de dispersie) și printr-o vîscozitate foarte mare. Citoplasma se caracterizează printr-o continuă tranziție *sol-gel*, dinamism propriu ma-

teriei vii. Tranzițiile sînt induse de factori endogeni (diviziunea sau faza sintetică a ciclului celular) sau exogeni (temperatură, lumină, pH) și explică viscozitatea și elasticitatea celulei.

4.3. DIFERENȚIERILE CITOPLASMATICE: FILAMENTELE DE MIOZINA, FILAMENTELE DE ACTINĂ, FILAMENTELE INTERMEDIARE ȘI MICROTUBULII

În ultimii ani, datorită progreselor foarte mari ce s-au realizat în caracterizarea moleculară a microtubulilor și a celorlalte tipuri de filamente, a devenit clar că acestea se pot găsi în oricare celulă eucariotă și s-au dezvoltat importante aplicații practice în scop diagnostic într-o serie de boli (cancer, boli genetice). O caracteristică generală a diferențierilor citoplasmatiche o constituie faptul că sînt formate prin polimerizarea unor proteine monomer aflate în citosol. Cu excepția filamentelor din celulele musculare și a complexelor de microtubuli din cili, flageli, corpii bazali ai acestora și centrioli, celelalte diferențieri citoplasmatiche se asamblează sau se dezassemblează relativ rapid în funcție de necesitățile celulei.

4.3.1. FILAMENTELE DE MIOZINA

S-au descris inițial în mușchi, unde au structura tipică sub forma *filamentelor groase* din miofibrile. Ulterior s-au observat și în celulele nemusculare filamente de miozină, deși dimensiunile mici și caracterul tranzitoriu le face greu de observat la microscopul electronic.

Se formează prin polimerizarea proteinelor numite *miozine*, care se găsesc în aproape toate celulele eucariote. Cu excepția celulelor musculare, în celelalte celule miozinele apar în cantitate mult mai mică decît actinele.

Molecula de miozină este formată din șase lanțuri polipeptidice: două lanțuri grele avînd fiecare 200.000 daltoni și două perechi de lanțuri ușoare, o pereche avînd lanțuri cu greutatea de 20.000 daltoni și cealaltă cu lanțuri de 16.000 daltoni. Deci greutatea moleculară a miozinei este de circa 470.000 daltoni. Lanțul greu are două porțiuni distincte: o porțiune alungită α -helicoidală și un cap globular (fig. 4.1.). Porțiunile alungite ale lanțurilor grele sînt răsucite în spirală una în jurul celeilalte, pe cînd capetele globulare rămîn separate. De fiecare cap se leagă cîte un lanț polipeptidic din fiecare pereche de lanțuri ușoare. În ansamblu deci, molecula de miozină are o coadă (lungă de 134 nm) și un cap bilobat (de circa 20 nm). Prin digestie cu papaină se pot „reteza capetele“, fiecare devenind cîte un *subfragment 1*, (sau

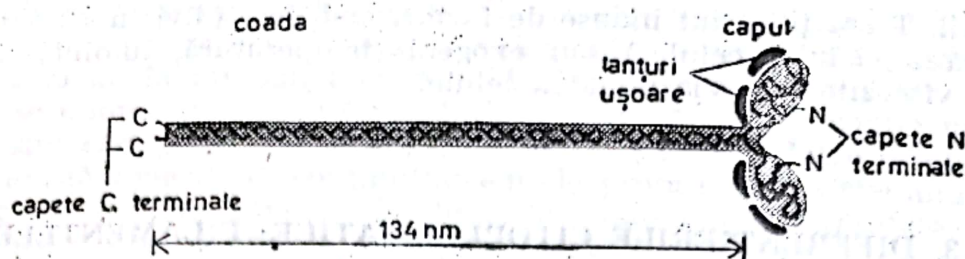


Fig. 4.1. Reprezentarea schematică a moleculei de miozină (fig. 4.1–4.8. sînt după Alberts și colab., 1983).

fragment S1), cu greutatea de circa 120.000 daltoni. Restul moleculei formează bagheta de miozină (fig. 4.2.).

Miozina se caracterizează prin capacitatea de a interacționa cu actina și printr-o activitate ATP-azică (este deci și o enzimă) stimulată mult de actină (de circa 300 ori). Ambele proprietăți se datorează capetelor globulare. Stimularea activității ATP-azice, care se produce și în condiții fiziologice, se explică nu prin activarea hidrolizei propriuzise sau a legării ATP-ului de miozină, ci prin faptul că produșii de hidroliză (ADP și fosfatul anorganic) rămîn strîns legați (necovalent) de miozină și împiedică legarea altei molecule de ATP. Actina preia ADP și fosfatul anorganic și astfel permite miozinei să lege altă moleculă de ATP care este rapid hidrolizată. Aceste procese apar în cursul contracției musculare și a celorlalte mișcări ce au la bază mecanismul actină-miozină.

Filamentele de miozină se formează prin polimerizarea moleculelor de miozină. Polimerizarea se produce într-un mod particular, prin agregarea cozilor moleculelor de miozină, în timp ce capetele rămîn la exterior. Astfel filamentul de miozină are o structură bipolară, cu o zonă „nudă” la mijloc (unde se unesc cozile miozinelor) și cu două zone la extremități, mai groase, în care proemină de jur împrejurul filamentului capetele globulare ale miozinelor. (fig. 4.3.).

Filamentele de miozină din celulele nemusculare sînt agregate mici, formate prin polimerizarea a circa 10–20 molecule și au caracter labil (fig. 4.4.). De aceea sînt greu de observat și de obicei în celulele nemusculare miozina este asociată cu actină, avînd rol în mișcările ce au la bază mecanismul actină-miozină.

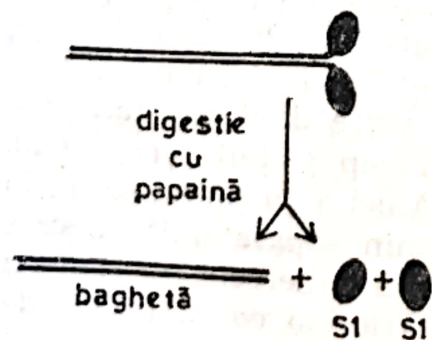


Fig. 4.2. Digestia moleculei de miozină cu papaină.

În celulele musculare polimerizează circa 500 molecule de miozină, formînd *filamentele groase*, cu diametrul de 10–20 nm și care se recunosc la microscopul electronic și prin capetele globulare ale miozinelor ce proemină la polii filamentului. În miofibrile, filamentele groase se găsesc dispuse paralel cu filamentele subțiri (formate din actină), fiind aranjate într-o rețea hexago-



Fig. 4.3. Schema filamentului de miozină din celulele musculare.

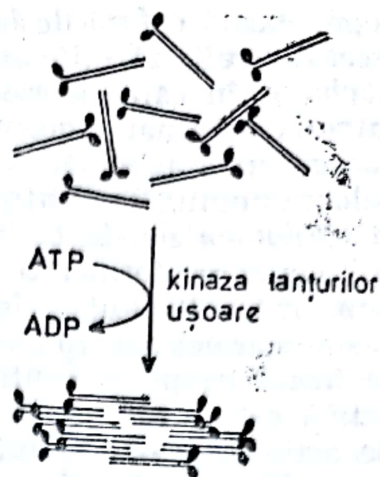


Fig. 4.4. Schema agregării miozinei în celulele nemusculare.

nală, cu filamentele subțiri plasate între cele groase (deci la un filament gros revin 6 filamente subțiri) (fig. 5.2.). Rolul filamentelor groase este de a produce contracția musculară prin interacțiunea cu filamentele subțiri.

4.3.2. FILAMENTELE DE ACTINA (MICROFILAMENTELE ȘI FILAMENTELE SUBȚIRI)

Filamentele de actină se întâlnesc în celulele nemusculare unde se mai numesc *microfilamente*, pe când în celulele musculare filamentele de actină mai conțin și alte proteine asociate, împreună cu care formează *filamentele subțiri*. Acestea sînt formate din proteinele numite *actine*. În diferitele celule ale organismului se găsesc actine asemănătoare, dar nu identice cu actina musculară, în privința greutății moleculare, a compoziției în aminoacizi etc. Este important de subliniat că, actinele reprezintă o proporție mare din totalul proteinelor celulei eucariote (5—15%).

Actinele au toate o proprietate caracteristică: pot exista în formă monomerică (numită și *actina globulară* sau *actina G*) și formă polimerizată (numită și *actina filamentoasă* sau *actina F*), formă ce constituie filamentele de actină. Actina G este compusă dintr-un singur polipeptid cu greutate moleculară de circa 42.000 și are formă aproximativ globulară cu diametrul de circa 4 nm (în realitate are formă de pară cu lungimea de 6,5 nm și lățimea de 4 nm în partea mai groasă). Fiecare moleculă de actină G are asociat un ion de Ca^{2+} , strîns legat, ce stabilizează conformația globulară, precum și o moleculă de ATP, care nu este legat covalent.

Polimerizarea actinei este mult accelerată de ATP care hidrolizează la ADP și fosfat anorganic numai după ce o moleculă de actină se leagă de polimer. Polimerizarea actinei nu se desfășoară uniform, ci la în-

ceput există o fază de lag, în care polimerizarea se face cu viteză mică. Aceasta reflectă dificultatea primului pas în polimerizare, numit și *nucleere*, în care se asociază primele două sau trei molecule de actină într-o conformație geometrică specifică. După aceea polimerizarea decurge rapid, pînă cînd concentrația monomerilor de actină scade la o valoare numită *concentrație critică*.

Filamentele de actină (numite și *microfilamente*) se formează prin polimerizarea formei G și constau din două lanțuri de actine înfășurate unul în jurul celuilalt, formînd un dublu helix răsucit spre dreapta avînd pasul spiralei de 70—80 nm. În fiecare lanț monomerii de actine G se înșiră ca perlele într-un șirag (fig. 4.5.). Diametrul filamentului de actină este în jur de 6 nm. Este important de subliniat că filamentul de actină are o polaritate, adică cele două capete sînt diferite. Polaritatea filamentului de actină, vizibilă în felul cum interacționează cu miozina, este esențială pentru funcția sa în motilitatea celulară. Fiecare moleculă de actină din microfilament este capabilă să lege cîte un cap al moleculei de miozină (fragmentul S1). Dacă se adaugă *in vitro* microfilamentelor fragmente S1 se obțin *filamentele de actină decorate*, în care fiecare fragment S1 proemină lateral. Examinat la microscopul electronic prin colorație negativă, un asemenea filament decorat are aspectul unui șirag de vîrfuri de săgeți, care toate sînt îndreptate în aceeași direcție. În alte filamente direcția „vîrfurilor de săgeți” poate fi opusă; această orientare indică polaritatea filamentului de actină, adică faptul că cele două capete ale filamentului sînt diferite.

Filamentele de actină se găsesc în toate celulele eucariote. În celulele nemusculare microfilamentele se pot găsi izolate, dar ele apar mai ales în mănunchiuri dispuse la periferia citoplasmei, în citoplasmă, imediat sub plasmalemă (cum este cazul *fibrelor de stress* în cazul celulelor în cultură) sau intrînd în structura unor *inele contractile*. Astfel sînt: a) inelul tranzitoriu ce apare în faza finală a diviziunii celulare și duce la strangularea citoplasmei între cele două nuclee și apoi la separarea celulelor fiice, și b) inelul permanent aflat în zona apicală a celulelor epiteliale (numit și desmozom „în centură”). De asemenea, se întîlnesc ansambluri sau mănunchiuri de filamente de actină în prelungirile celulare cu caracter permanent (*microvilii* din mucoasa intestinală și *stereocilii* din urechea internă). Ansamblurile conțin filamente de actină așezate paralel, cu helixurile lor avînd pasurile la același nivel și din loc în loc filamentele sînt unite printr-o proteină numită *fimbrină* (ca niște puncte de sudură) (fig. 4.8.). Există și mănunchiuri de filamente de actină în prelungirile cu caracter temporar (cum sînt prelun-

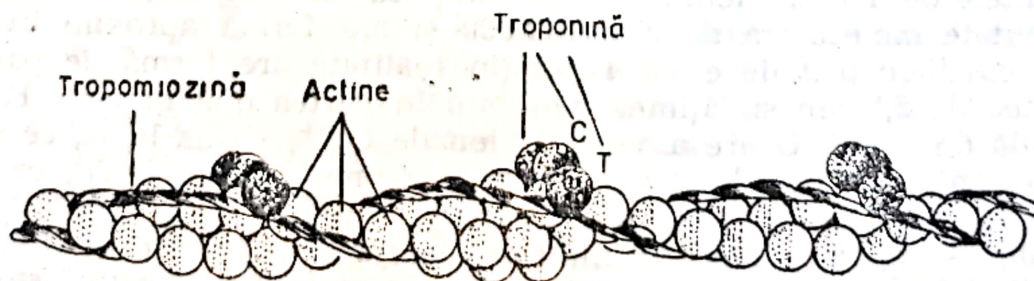


Fig. 4.5. Schema filamentului subțire (filamentul de actină din mușchi).

girile filiforme emise de unele celule în cultură). În toate aceste cazuri întâlnite în celulele nemusculare microfilamentele au două roluri: unul structural sau de susținere (de exemplu formînd suportul prelungerilor amintite) și al doilea dinamic, în mișcările celulare ce au la bază mecanismul molecular actină-miozină. Din acest punct de vedere mănunchiurile de microfilamente pot fi comparate cu „ansambluri intracelulare asemănătoare mușchilor”. Întotdeauna microfilamentele din celulele nemusculare conțin și miozină asociată actinei.

Filamentele de actină se află în echilibru cu monomerii de actină din citosol și acest echilibru între polimerizarea și depolimerizarea actinei joacă rol esențial în mișcările celulare bazate pe actină-miozină.

Polimerizarea actinei este însoțită de creșterea marcată a vîscozității citoplasmei, pe cînd depolimerizarea se asociază cu scăderea vîscozității. Aceste procese de polimerizare — depolimerizare a actinei joacă rolul principal în tranzițiile între starea de gel și cea de sol a citoplasmei.

Polimerizarea actinei este influențată mult și de unele droguri. Astfel, polimerizarea este inhibată de *citocalazine* (B, C, D etc.), familie de metaboliți secretați de diferite mucegaiuri, care inhibă mișcările celulare avînd la bază mecanismul actină-miozină (de pildă mișcarea de locomoție ameboidală sau fagocitoza).

Dimpotrivă, *faloidina*, un alcaloid foarte toxic produs de ciuperca *Amanita phalloides*, inhibă depolimerizarea și stabilizează filamentele de actină.

În celulele musculare filamentele de actină mai conțin și alte proteine, cu care împreună formează *filamentele subțiri* (fig. 4.5.). În acestea, la exteriorul filamentului de actină pe toată lungimea lui, se găsesc înfășurate molecule alungite din proteina numită *tropomiozină*. Din loc în loc pe lungimea filamentului se află dispusă o altă proteină numită *troponină*, de fapt un complex de trei polipeptide (troponinele T, I și C), care au rolul de a interacționa cu ionul de Ca^{2+} și în acest fel de a media reglarea contracției musculare indusă de ionul de Ca^{2+} . În această mediere intervine și *tropomiozina*, deși ea mai are și rol structural de a întări filamentul subțire. Filamentele subțiri se găsesc numai în mușchii scheletici și în mușchiul cardiac; în miofibrilele din acești mușchi filamentele subțiri se află aranjate ordonat și dispuse paralel cu *filamentele groase* de miozină, împreună participînd la realizarea *contracției musculare*.

4.3.3. FILAMENTELE INTERMEDIARE

Acum 10 ani nu se știa aproape nimic despre componentele filamentelor intermediare. Într-un interval de circa 5 ani, după 1978, cunoștințele despre filamentele intermediare s-au dezvoltat exploziv: s-au precizat compoziția chimică, tipurile de filamente intermediare, celulele în care apar și, pe această bază, s-au dezvoltat aplicații medicale importante.

Numele de filamente intermediare vine de la dimensiunile lor: diametrul acestor filamente, de 10 nm, este cuprins între valoarea diametrului filamentelor de actină și a diametrului microtubulilor. Se prezintă la microscopul electronic sub forma unor filamente rectilinii sau ușor curbate, care se găsesc în general în endoplasmă, dar pot apare și la periferia celulei (în structuri speciale cum sînt desmozomii) sau în prelungiri (de pildă în axonul neuronului). Caracteristic pentru filamentele intermediare este faptul că sînt structuri mult mai stabile decît filamentele de actină sau microtubulii. Dacă aceste din urmă două categorii de diferențieri citoplasmatiche se află în echilibru cu un rezervor de monomeri din citosol, dimpotrivă, filamentele intermediare odată asamblate nu se depolimerizează.

Filamentele intermediare se deosebesc de celelalte două componente ale citoscheletului și prin proteinele din care sînt formate. Astfel, dacă actinele și tubulinele sînt molecule globulare, proteinele din filamentele intermediare sînt molecule filiforme. Polimerizarea lor nu se face prin înșiruirea monomerilor, ci prin alăturarea și împletirea lor ca într-o frînghie (la fel ca și collagenul). În acest fel rezultă structuri rezistente, ce pot fi întărite, la nevoie, și prin legături covalente între subunități.

O altă deosebire importantă între filamentele de actină și microtubuli, pe de o parte, și filamentele intermediare, pe de altă parte, este aceea că proteinele ce alcătuiesc filamentele intermediare sînt foarte diferite, după tipul de celulă în care apar și după specie. Mai mult, chiar în structura unui tip de filament intermediar intră mai multe polipeptide diferite, cu greutatea moleculare ce variază în limite largi. De exemplu, neurofilamentele din axonii mamiferelor sînt formate din trei polipeptide, cu greutatea moleculare de 70.000, 140.000 și 210.000 daltoni, pe cînd cele din axonul de sepie au numai două polipeptide, de 60.000 și 200.000 daltoni (Alberts și colab., 1983). Există omologii (sevențe asemănătoare) de aminoacizi între proteinele ce alcătuiesc filamentele intermediare, omologii mai pronunțate cînd este vorba de același tip de țesut la diferite specii, față de diferite țesuturi la aceeași specie.

Există cinci tipuri de filamente intermediare:

1. *Filamentele de cheratină* (numite și *tonofilamente*): sînt caracteristice pentru *celula epitelială*, fiind formate din circa 20 proteine de 40.000—70.000 daltoni și apar în epitelii. Formează o rețea neregulată prin celulele epiteliale, fiind ancorate în joncțiunile intercelulare numite desmozomi. Au rol structural, asigurînd rezistența epiteliiilor la factori mecanici etc. Filamentele de cheratină se acumulează în celulele epiteliale mature din piele, unde devin din ce în ce mai mult legate prin punți disulfidice pe măsură ce aceste celule îmbătrînesc. Chiar după moartea celulelor continuă să formeze un strat protector, cum este stratul cornos al epidermului sau părul și unghiile.

2. *Neurofilamentele*, caracteristice *neuronului*, sînt formate din trei polipeptide (menționate mai sus) și se întîlnesc în axonii neuronului, avînd probabil rol de susținere pentru axoni, care au peste un metru lungime și sînt structuri relativ fixe pentru toată viața.

3. *Filamentele de vimentină*, caracteristice pentru *celulele mezenchimale*, sînt formate din proteina numită vimentină, cu greutatea mo-

leculară de 55.000 daltoni. Se găsesc în fibroblaste, condroblaste, macrofage, celule endoteliale, celule musculare netede. Vimentina poate copolimeriza și cu alte proteine intrind în structura altor categorii de filamente intermediare.

4. *Filamentele gliale*, caracteristice pentru *celula glială*, formate din vimentină și o *proteină glială fibrilară acidă* cu greutatea moleculară de 53.000 daltoni, se găsesc în astrocite.

5. *Filamentele de desmină*, caracteristice *mușchiului*, formate dintr-o proteină de 52.000 daltoni, se găsesc în mușchii scheletici și netezi (cu excepția mușchilor netezi din pereții vaselor). Îndeplinesc probabil un rol structural, de susținere a miofibrilelor adiacente.

Deci filamentele intermediare au cu precădere rol structural și compoziția lor este în concordanță cu acest rol. Pot fi însă dezasamblate prin digestia lor cu enzime proteolitice, specifice tipului de filament și activate de Ca^{2+} . Nu se știe precis în ce condiții aceasta se întâmplă în celulă, deși s-au observat rupturi ale unor filamente intermediare în multe celule în cursul mitozei. Este posibil ca filamentele intermediare să fie implicate în interacțiunea dintre mediul înconjurător și aparatul genetic al celulei (Birchmeier, 1984). Recent s-a observat că injectarea în celule cultivate (fibroblaste) de anticorpi monoclonali îndreptați împotriva vimentinei a dus la colapsul filamentelor intermediare într-un buton aproape de nucleu, dar creșterea, diviziunea, mișcările și forma celulei nu s-au modificat. Funcțiile filamentelor intermediare rămân încă prea puțin cunoscute (Alberts și colab. 1983). În schimb identificarea tipurilor de filamente intermediare prin anticorpi monoclonali îndreptați împotriva proteinelor componente s-a dovedit a fi de mare importanță pentru diagnosticul tumorilor maligne la om. Astfel, carcinoamele au filamente de cheratină, pe când sarcoamele filamente de vimentină. Rabdomiosarcoamele au filamente de desmină, gliomele au filamente gliale, iar neuroblastoamele au neurofilamente. Chiar și în metastaze se păstrează tipul de filamente intermediare caracteristice țesutului (tipului de celulă) de origine, ceea ce are o mare importanță diagnostică. Identificarea tipului de filament intermediar se face prin anticorpi monoclonali marcați fluorescent sau cuplați cu o enzimă capabilă a da o reacție de culoare. Aplicați pe secțiuni, acestea devin fluorescente sau se colorează numai când conțin acea proteină față de care sînt îndreptați anticorpii. De pildă o secțiune printr-un carcinom va deveni fluorescentă sau da reacția de culoare numai dacă este tratată cu anticorpi anti-cheratină nu și cu cei anti-desmină.

4.3.4. MICROTUBULII

Aceste diferențieri citoplasmatică se formează prin polimerizarea proteinelor numite *tubuline*, proteine globulare cu greutatea moleculară de circa 50.000 daltoni. La polimerizare participă de fapt un dimer format din două polipeptide, α -*tubulina*, și β -*tubulina*, ce au secvența asemănătoare de aminoacizi. În cursul asamblării microtubulilor dimerii

de tubuline polimerizează formînd *protofilamente* (numite și *protofibrile*), cu diametrul de circa 5 nm. În protofibrile dimerii formează rînduri aranjate în așa fel încît α -tubulina de la un dimer se leagă cu β -tubulina de la dimerul din rîndul vecin (fig. 4.6.).

Microtubulul este format prin aranjarea a 13 asemenea protofibrile sub forma unui cilindru (fig. 4.6.) avînd interiorul aparent gol. Diametrul extern al microtubulului este de 25 nm, constant în toate cazurile. Microtubulii sînt rectilinii, avînd o lungime de cîtiva μm .

Asamblarea tubulinelor în microtubuli prezintă asemănări cu asamblarea actinei în microfilamente. Și tubulinele au un nucleotid legat și la polimerizare acesta hidrolizează. Dar la polimerizarea tubulinei nucleotidul implicat este GTP și nu ATP (ca la actină) și există două molecule de GTP legate pe un dimer de tubuline. Hidroliza nucleotidului are și în cazul tubulinei o influență hotărîtoare asupra cineticii polimerizării. (De fapt hidrolizează numai o moleculă de GTP, iar GDP și cu cea de a doua moleculă de GTP rămîn legați pe dimer). Microtubulii au și ei o polaritate, ca și filamentele de actină. În fiecare microtubul adaosul dimerilor are loc predominant la un capăt (deci crește într-o direcție), în timp ce la capătul opus are loc predominant dezasamblarea (prin depolimerizarea tubulinei; fig. 4.6.).

Polimerizarea tubulinei este un proces de autoasamblare, care se petrece spontan la temperatura de 37°C , în timp ce la 0°C are loc depolimerizarea microtubulilor. Pentru polimerizare sînt necesari și cationi bivalenți (Ca^{2+} , Mg^{2+}) în concentrație mică (micromolară). De

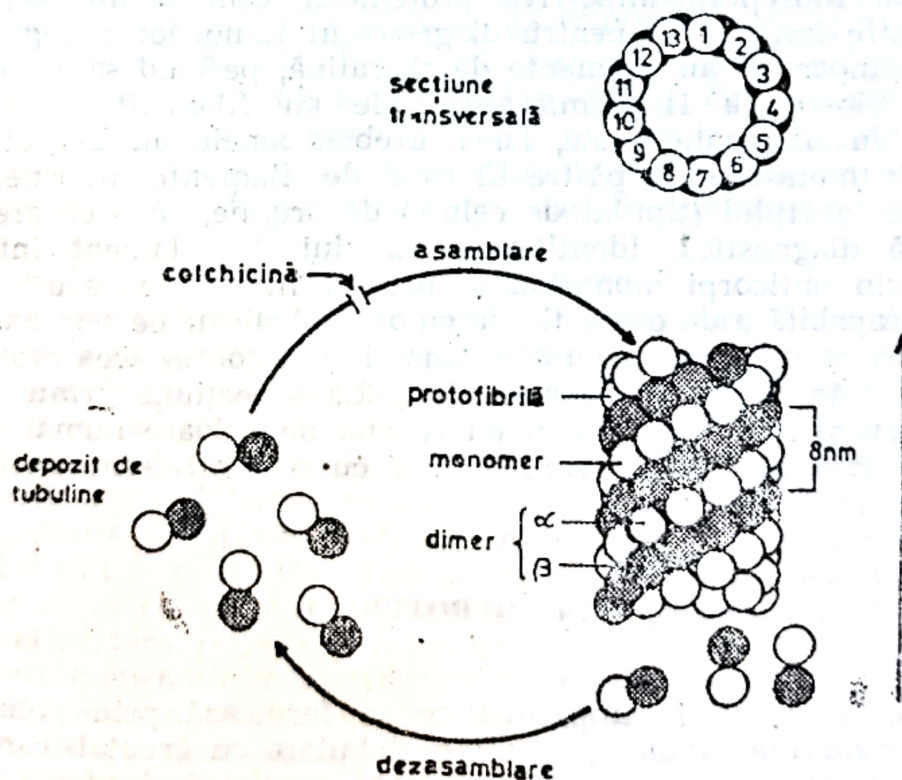


Fig. 4.6. Schema asamblării unei protofibrile din dimeri de tubuline și secțiune transversală printr-un microtubul arătînd cele 13 protofibrile.

asemenea polimerizarea este mult accelerată prin prezența unor proteine. S-au identificat două clase de astfel de proteine: *proteinele asociate microtubulilor* (MAPs) și *proteinele tau*. Există cel puțin două proteine asociate microtubulilor, avînd greutatea moleculară mari (între 200.000 și 300.000 daltoni). Aceste proteine se pare că au două domenii ale moleculei, printr-unul se leagă simultan de mai multe molecule de tubuline de pe microtubul și prin aceasta favorizează polimerizarea tubulinei, în timp ce prin celălalt domeniu leagă microtubulul de alte componente celulare. Proteinele tau, cu greutatea moleculară de 60.000—70.000 daltoni, au numai prima acțiune, de a favoriza polimerizarea microtubulilor prin legarea simultană de mai multe molecule de tubuline.

Microtubulii se pot găsi liberi în citoplasmă sau formînd ansambluri de microtubuli în unele organite celulare; cili și flageli (în axonemele lor), corpii bazali ai cililor și flagelilor, centriolii, aparatul mitotic (format din aster și fusul de diviziune). Aceste ansambluri sînt descrise la capitolele respective.

Este de subliniat faptul că stabilitatea microtubulilor variază foarte mult. Astfel, microtubulii liberi din citosol și cei din aster și fusul de diviziune sînt structuri labile, spre deosebire de complexe de microtubuli din axoneme, centrioli și corpii bazali. În perioada dintre diviziunile celulare (în interfază) microtubulii sînt asamblați sub controlul *centrului celular* (numit și *centrozom*), care are în centrul său o pereche de centrioli. Centrul celular acționează ca un centru de nucleere din care pornesc microtubuli liberi. Microtubulii din axonema cililor și flagelilor sînt organizați în mod analog de către corpii bazali ai acestora, dar, spre deosebire de microtubulii liberi și cei din fusul de diviziune, sînt structuri mai stabile. La începutul mitozei microtubulii liberi din citosol se dezassemblează, pe măsură ce se assemblează microtubulii din aster și fusul de diviziune. La sfîrșitul mitozei se produce procesul invers. Aceste procese depind de schimbul de tubuline dintre microtubul și depozitul de tubuline din citosol. Există în permanență un echilibru între monomerii de tubuline din depozitul aflat în citosol și între microtubulii din citoplasmă. S-a estimat că la o celulă în cultură circa 50% din totalul tubulinelor se află depolimerizate în citosol.

Polimerizarea tubulinei este influențată și de *medicamente*. Astfel, *colchicina*, un alcaloid, blochează polimerizarea tubulinei prin legarea unei molecule de colchicină de un dimer de α - și β -tubulină. Același acțiune o are și compusul înrudit numit *colcemid*. Adăugate la celule în diviziune, substanțele acestea blochează mitoză prin depolimerizarea fusului de diviziune, deci au acțiune antimitotică. Formarea microtubulilor este blocată și de către *vinblastină* și *vincristină*, folosite ca citostatice, bazat pe faptul că distrugerea fusului de diviziune omoară preferențial celulele ce se divid rapid (între care se numără și celulele maligne).

Dimpotrivă, medicamentul numit *taxol* favorizează polimerizarea și stabilizează microtubulii. O acțiune similară are și apa grea (D_2O).

În mod surprinzător, consecințele pentru celulă sînt la fel de nocive ca și în cazul substanțelor ce produc depolimerizarea microtubulilor. De pildă o celulă cu microtubuli stabiliizați este incapabilă să-și continue ciclul celular, oprindu-se în mitoză.

* Microtubulii au două roluri principale în celulă. Unul este cel *structural*, microtubulii fiind probabil principalele componente ce determină forma celulei și a prelungirilor sale permanente: axoni și dendrite în neuroni, cili și flageli în celulele dotate cu aceste organite. Legat de acest rol este și modificarea formei celulelor în cursul diferențierii acestora (în cursul morfogenezei), de exemplu creșterea prelungirilor în cursul diferențierii neuronului. De asemenea, microtubulii par să joace rolul hotărîtor în determinarea geometriei spațiale a celulei (o proprietate ce o au toate celulele eucariote și care se reflectă în poziția organitelor celulare și caracteristicile suprafeței externe). Astfel, microtubulii sînt aliniați paralel cu axa lungă a celulei, sau mențin forma asimetrică a unor celule.

Microtubulilor li se atribuie un rol de „organizatori ai citoscheletului”. Astfel, ei determină distribuția filamentelor intermediare în celulă. La fibroblaste în cultură de exemplu, atât microtubulii, cît și filamentele intermediare au distribuție radiară, dintr-o zonă situată în vecinătatea nucleului spre periferia celulei. Dacă se induce depolimerizarea rapidă (în cîteva minute) a microtubulilor prin tratarea celulelor cu colchicină, în cîteva ore se produce colapsul filamentelor intermediare într-un buton situat în vecinătatea nucleului. Dacă se îndepărtează colchicina, microtubulii repolimerizează rapid și filamentele intermediare își recapătă distribuția radiară normală. Există dovezi că microtubulii influențează și distribuția filamentelor de actină. De pildă inelul contractil de actină, ce desparte cele două celule la sfîrșitul diviziunii celulare, apare întotdeauna între cei doi cenetri celulari. Dacă se deplasează mecanic fusul de diviziune într-o jumătate a celulei ce se divide, atunci inelul contractil se formează numai în acea jumătate, deci celula este despicată incomplet la sfîrșitul diviziunii (Alberts și colab., 1983).

În sfîrșit, legat de rolul structural al microtubulilor li se atribuie acestora funcția de „schele temporare” pentru ca celula să-și poată „construi” aranjamente speciale ale componentelor sale. Astfel, în cursul spermatogenezei cînd se dezvoltă coada spermatozoidului apar microtubuli dispuși în spirală în jurul axonemei, care apoi dispar, dar lasă în locul lor mitocondrii aranjate în spirală în jurul axonemei, căreia îi furnizează ATP necesar mișcării flagelului.

Al doilea rol al microtubulilor este cel *dinamic*, ei asigurînd toate mișcările celulare ce au la bază sistemul molecular microtubul-dineină (vezi capitolul următor).

Pe lîngă aceste roluri microtubulii au mai fost implicați în formarea unor canale prin care se asigură transportul unor macromolecule în citoplasmă, iar prezența unor mînunchiuri de microtubuli în unii receptori senzoriali ar sugera o funcție în conversia energiei la stimularea receptorilor (De Robertis și De Robertis, 1981).

4.4. CITOSCHELETUL

Până acum s-au tratat diferențierile citoplasmatiche ca și cum ar fi componente independente, dar în realitate ele sînt integrate într-o rețea proteică numită citoschelet. Este interesant că încă în anii 1870—1885 citoplasma apărea străbătută de o rețea proteică după fixare și colorare, dar mulți citologi considerau aceste aspecte doar ca artefacte. Chiar numele de citoschelet a fost ales prin 1929 de Koltzoff (cit. de De Robertis și De Robertis, 1981), care spunea: „fiecare celulă are un sistem de componente lichide și schelete rigide care generează forma ei”. Numele de citoschelet a fost abandonat însă pentru mulți ani fiindcă structurile vizibile la microscopul optic au fost considerate artefacte de fixare.

De-abia în ultimii ani microscopia electronică a revelat adevărata ultrastructură a citoscheletului și au început să se înțeleagă funcțiile sale importante, iar acest capitol devine unul dintre cele mai dinamice din întreaga biologie moleculară a celulei eucariote și probabil își va păstra încă o bună perioadă de timp acest caracter. De asemenea, aplicații practice importante, inclusiv pentru practica medicală, justifică și ele atenția ce i se acordă în prezent acestei părți a citoplasmei.

Citoscheletul este o rețea complexă tridimensională de filamente proteice și microtubuli care străbat întreaga hialoplasmă, întretinându-se în toate direcțiile și de care depind forma celulei, mișcările celulare, organizarea internă spațială a citoplasmei (de pildă menținerea în anumite poziții a organitelor celulare sau asocierea într-un mod specific a enzimelor anumitor căi metabolice). Termenul de citoschelet sugerează o analogie cu scheletul organismului uman, dar, pe lângă rolul structural, citoscheletul are și rol în motilitate, deci o caracterizare mai adecvată a citoscheletului ar putea fi făcută considerîndu-l drept „oasele și mușchii” celulei eucariote. Citoscheletul este o structură extrem de dinamică, ce se schimbă dintr-o clipă în alta, în funcție de necesitățile de moment ale celulei. În alcătuirea citoscheletului rolul principal îl au trei tipuri de diferențieri citoplasmatiche: *filamentele de actină*, *filamentele intermediare* și *microtubulii*. Caracterul dinamic îl asigură în primul rînd procesele de polimerizare și depolimerizare ale filamentelor de actină și ale microtubulilor. Aceste două componente ale citoscheletului se assemblează și se dezassemblează rapid în celulă, existînd în hialoplasmă un depozit permanent de monomeri (actinele G și dimerii de tubuline). Cea de a treia componentă a citoscheletului, filamentele intermediare, sînt structuri mult mai stabile decît microfilamentele și microtubulii.

Pe lângă cele trei tipuri majore de diferențieri citoplasmatiche, citoscheletul mai conține și multe alte proteine accesorii, care leagă filamentele unele de altele, sau se leagă de alte componente celulare, de pildă de plasmalemă, sau influențează polimerizarea filamentelor. Citoscheletul poate fi evidențiat prin tratarea (injectare în celulă sau tratarea secțiunilor de țesut) celulelor cu anticorpi îndreptați împotriva actinei, tubulinei, a proteinelor din filamentele intermediare sau împotriva proteinelor accesorii. Anticorpii sînt marcați fluorescent și astfel

imaginea observată la microscopul electronic cu fluorescență roșă foarte clar întreaga rețea intricată a citoscheletului. Se pot de asemenea injecta în celule componentele citoscheletului marcate fluorescent și ele se atașează pe citoscheletul nativ pe care-l revelează.

Dinamismul scheletului, realizat în esență prin polimerizarea sau depolimerizarea filamentelor sale, stă la baza mișcărilor celulare și a modificărilor de formă a celulei. Filamentele de actină și microtubulii din citoschelet se assemblează în funcție de necesitățile celulei, deci componentele lor se află în permanență în echilibru cu monomerii din citosol. Unele detalii asupra modului în care se produc polimerizarea și depolimerizarea sînt importante pentru înțelegerea modului în care dinamismul citoscheletului este reglat în celulă.

S-a menționat deja că atât microfilamentele cît și microtubulii au o polaritate, adică depolimerizarea și polimerizarea au viteze diferite la capete. Astfel, la un capăt viteza polimerizării este mult mai mare ca cea a depolimerizării. Rezultatul este că la acest capăt (notat cu +) filamentul de actină sau microtubulul se alungește. Dimpotrivă, la capătul opus (notat cu -) viteza depolimerizării este mai mare. Acest lucru are consecințe importante. Astfel, la o anumită concentrație de monomeri liberi în citosol, microfilamentul sau microtubulul se află într-o stare de echilibru, în care la un capăt se adaugă în mod predominant monomeri, pe cînd la celălalt se îndepărtează. Deci, dacă se urmărește un grup de monomeri adăugați la capătul (+), acest grup se deplasează în lungul microtubulului pînă la capătul (-), unde monomerii trec în citosol (fig. 4.7.).

Dacă se protejează capătul (-) și se împiedică astfel depolimerizarea, rezultă creșterea lungimii microtubulului. De aceea microtubulii liberi au capătul (-) inserat în centrul celular, sau cei din cili și flageli inserat în corpii bazali ai acestor structuri. Dacă rămîne neprotejat capătul (-), atunci se produce depolimerizarea microtubulului, fiindcă concentrația de tubuline libere din citoplasmă este prea mică pentru a putea compensa depolimerizarea de la capătul (-) cu o polimerizare suficient de rapidă la capătul (+).

În 1984 s-au înregistrat progrese în cunoașterea modului în care ATP și GTP controlează polimerizarea actinei și, respectiv, a tubulinei. Spre deosebire de concepțiile mai vechi, s-a constatat că polimerizarea

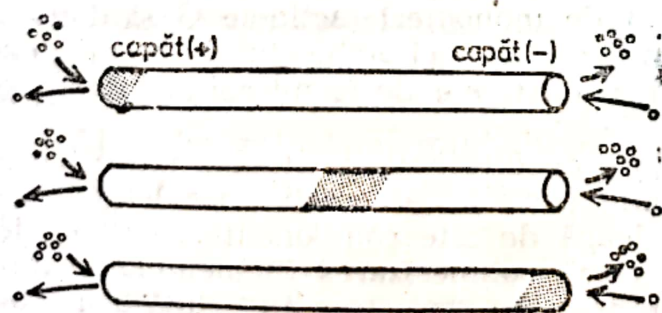


Fig. 4.7. Schema microtubulului arătînd la capătul (+) predominarea polimerizării și la capătul (-) a depolimerizării.

și hidroliza nucleotidului nu se desfășoară simultan. Astfel, monomerii de actină leagă întîi ATP și apoi se leagă de capătul unui microfilament. Hidroliza ATP se produce abia la 10 secunde după polimerizare. Consecința este că în acest interval se leagă mai mulți monomeri cu ATP, deci la capătul filamentului există mai multe actine cu ATP (capătul cu ATP). După hidroliză

fosfatul anorganic este eliberat, în timp ce ADP rămâne legat de filament; deci la mijlocul filamentului există o zonă cu ADP legat de actine. La depolimerizarea filamentelor, când se ajunge la zona cu ADP, crește de cinci ori viteza depolimerizării. Deci la capătul cu ADP al filamentului predomină depolimerizarea (Wegner, 1984). Se poate considera capătul cu ATP drept (+), iar cel cu ADP, (—).

Analog, în cazul microtubulilor, dimerul de tubuline polimerizează având GTP legat, iar viteza hidrolizei este mai mică decât viteza polimerizării. Consecința este că microtubulul are un capăt cu GTP, cu atât mai lung cu cât viteza polimerizării este mai mare. Aceasta se întâmplă la concentrații mari de dimeri de tubulină când predomină polimerizarea. Când însă scade concentrația tubulinelor, capetele cu GTP devin mai scurte și este posibil ca prin variație statistică unii microtubuli să aibă la capete GDP. Cum la aceste capete viteza depolimerizării este de 100—1000 ori mai mare față de cea a polimerizării, are loc o depolimerizare „catastrofală” a microtubulilor cu GDP la capete, în timp ce aceia cu GTP continuă să crească (McIntosh, 1984). Acesta este modelul Mitchison și Kirschner (1984) pentru asamblarea microtubulilor, bazat pe prezența sau absența capătului cu GTP, ceea ce duce la polimerizare (alungirea microtubulului) sau depolimerizare (scurtarea pînă la dispariție a microtubulului). Este important ca celula să aibă un asemenea sistem de control al vitezei depolimerizării microfilamentelor și microtubulilor pentru a realiza modificările citoscheletului din cursul mișcărilor, a modificărilor formei celulei sau rearanjărilor extensive din mitoză. Microtubulii liberi își schimbă subunitățile cu cele solubile din citoplasmă în câteva minute, pe când microtubulii din fusul de diviziune își schimbă subunitățile în secunde.

Proteinele din citosol reglează polimerizarea sau depolimerizarea citoscheletului. Astfel, există proteine ce se leagă la unul din cele două capete ale filamentului de actină și în acest fel previn fie adaosul, fie desfacerea monomerilor de actină. Alte proteine, cum este *profilina*, se leagă de monomerii de actină și împiedică polimerizarea lor. Unele proteine acționează sub influența Ca^{2+} producînd fragmentarea filamentului de actină: astfel sînt *villina* și *gelsolina*. *Filamina* și *α -actinina* favorizează organizarea microfilamentelor într-o rețea tridimensională fiindcă leagă punctele de intersectare (nodurile rețelei). În sfîrșit schema instrucțiunilor diferitelor proteine cu filamentele de actină (fig. 4.8.) se mai poate completa și cu sudarea filamentelor paralele în mănunchiuri prin *fimbrină*, prin legarea tropomiozinei în lungul filamentelor sau prin interacțiunea dintre actină și miozină prin care se produce contracția în mișcările ce au la bază mecanismul molecular actină-miozină. În cazul microtubulilor s-a amintit despre *proteinele asociate microtubulilor* și *proteinele tau*.

Dinamismul citoscheletului este influențat foarte mult și de cationii *bivalenți*. Astfel, ionii de Ca^{2+} joacă un rol esențial: în funcție de concentrație Ca^{2+} induce polimerizarea sau depolimerizarea microtubulilor, reglează interacțiunile dintre actină și miozină și prin aceasta contractilitatea. De aceea concentrația Ca^{2+} în celulă este controlată de către membrana plasmatică ce împiedică intrarea Ca^{2+} în celulă, precum și

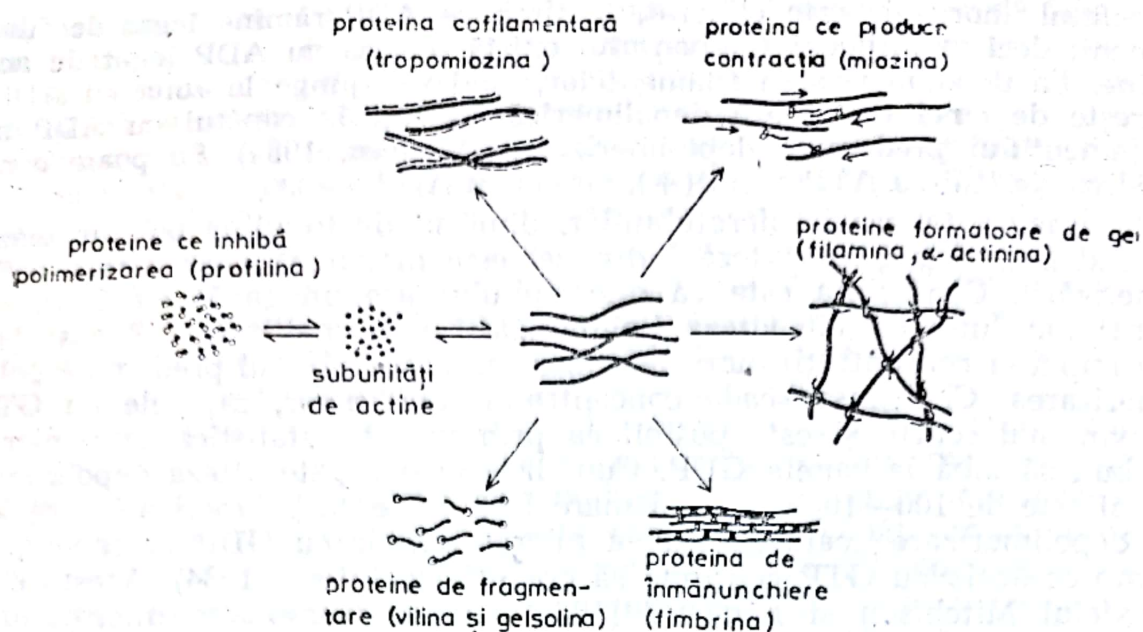


Fig. 4.8. Diagrama modificării polimerizării actinei sub influența diferitelor proteine ce se leagă de actină (descrierea în text).

prin sechestrarea Ca^{2+} în mitocondrii sau în vacuole specifice, iar în mușchi în reticulul sarcoplasmic.

Se pare că ionul de Ca^{2+} își exercită efectele sale prin intermediul unor proteine de legare a Ca^{2+} . Printre acestea se numără și *calmodulina*, o proteină formată din 148 aminoacizi, cu secvențe asemănătoare cu troponina C (care apare ca o formă specializată a calmodulinei). Calmodulina pare a fi receptor unic intracelular pentru Ca^{2+} , deoarece a fost găsită în toate celulele animale și vegetale examinate, este conservată în cursul evoluției și joacă rol important în majoritatea proceselor reglate de Ca^{2+} din celulele eucariote. Într-o celulă animală tipică se află 10^7 molecule de calmodulină, reprezentând 10% din totalul proteinelor celulei (Alberts și colab., 1983). Pe lângă microtubuli ionul de Ca^{2+} legat de calmodulină influențează și polimerizarea filamentelor de actină și a filamentelor intermediare.

În sfârșit, un alt factor ce influențează dinamismul citoscheletului îi constituie *nucleotidele*. De pildă, AMP ciclic favorizează polimerizarea citoscheletului, induce aglomerarea microfilamentelor și microtubulilor în ectoplasmă și în centrul prelungirilor celulelor stelate. Prin alterarea distribuției acestor diferențieri citoplasmatică, AMP ciclic modifică forma și motilitatea celulelor.

Funcțiile citoscheletului sînt complexe.

1. Citoscheletul menține forma celulei și o adaptează la necesitățile funcționale, inclusiv de moment ale celulei. Reiese din cele spuse la descrierea componentelor citoscheletului.

2. Realizarea tuturor mișcărilor celulei se face prin componentele citoscheletului. Această funcție se va detalia în capitoul următor.

3. Citoscheletul interacționează cu plasmalema. Acest lucru a devenit clar în special din studii pe eritrocite, la care sub plasmalemă a fost identificat un „citoschelet al membranei” (format dintr-o rețea de

actină și spectrine). Dacă se îndepărtează plasmalema eritrocitului cu detergenți, se păstrează acest citoschelet și forma eritrocitului nu se modifică. Dacă însă se îndepărtează citoscheletul membranei prin tratare cu soluții avînd forța ionică mică, celula se fragmentează în mici vezicule. Deci rețeaua citoscheletului membranei constituie un fel de suport pentru membrana propriu-zisă și menține forma celulei. S-au identificat proteine asemănătoare spectrinei și în alte celule pe lângă eritrocite. O astfel de proteină este *fodrina*. Citoscheletul membranei pare a stabili legături cu proteinele intrinseci din membrană.

Acestei rețele periferice a citoscheletului dispusă sub plasmalemă i se atribuie și un rol în transmiterea de informații prin plasmalemă, ceea ce trebuie să se întîmple și în cazul mișcărilor de locomotie. În plus, asemenea schimburi de informații apar și în cazul inhibiției de contact a proliferării celulelor cultivate pe suport.

Studiul interacțiunilor citoscheletului cu plasmalema este în actualitate. De pildă, filamentele de actină interacționează cu plasmalema prin intermediul unei proteine numită *vinculină*. Aceasta s-a izolat din *plăcile de adeziune* (regiuni specializate ale plasmalemei în care se termină *fibrelle de stress* ale fibroblastelor). Asemenea conectări ale mănunchiurilor de microfilamente la plasmalemă există și în cazul inelelor contractile amintite anterior.

4. Interacțiunea citoscheletului cu organele celulare a fost evidențiată prin observarea de asocieri ale microtubulilor cu mitocondriile, ale nucleilor cu microtubulii și filamentele intermediare, ale microtubulilor cu veziculele sinaptice și altele. De mare actualitate sînt cercetările menite să lămurească în ce măsură citoscheletul participă la menținerea în poziție și deplasările în celulă ale diferitelor organe.

De pildă, mitocondriile și lizozomii prezintă o mișcare individuală caracteristică, numită *mișcarea saltatorie*, prin care se mișcă foarte rapid („sar“) în linie dreaptă, oprindu-se din loc în loc și apoi pornind iar, uneori revin înapoi pe aceeași direcție sau o iau pe altă direcție. Pe imagini de microscopie electronică se pot vedea filamente subțiri între organe și filamentele proteice adiacente.

5. Interacțiunea citoscheletului cu macromolecule din citosol: s-au observat asocieri cu complexe de ribozomi sau chiar enzime glicolitice legate de filamentele de actină.

Mai mult, există observații ce sugerează implicarea citoscheletului în transportul proteinelor în lungul axonului neuronului. Astfel, dacă celulele nervoase sînt incubate cu aminoacizi marcați radioactiv, proteinele citoscheletului sintetizate în corpul celulei devin marcate și apoi sînt transportate în lungul axonului pînă la sinapsă foarte încet, cu o viteză de 1—5 mm pe zi (*transportul axonal lent*). După cîteva zile se separă două zone de radioactivitate în lungul axonului, una ce se deplasează mai încet, care include tubulinele și proteinele filamentelor intermediare, și alta ce se deplasează mai rapid. În această din urmă zonă s-au identificat actine și multe proteine considerate a fi solubile în citosol (creatinkinaza și enolaza). Deoarece aceste proteine se deplasează împreună chiar timp de cîteva luni, este clar că ele nu pot difuza liber în citoplasmă și se presupune că sînt în vreun fel asociate fizic filamentelor de actină.

Citoscheletul este mult modificat în celula malignă. De pildă fibroblastele transformate malign prin virusuri oncogene devin rotunde și fibrele de stress sînt absente sau mult reduse ca număr în asemenea celule.

Din cele de mai sus rezultă clar că cercetările privind citoscheletul sînt de mare actualitate.

4.5. MICROTRABECULELE

Recent s-au observat în hialoplasmă structuri fibrilare mai subțiri decît filamentele citoscheletului și care au fost denumite *microtrabecule*. Ele au fost descrise de către Porter și colab. (1978, 1979) în celulele examinate prin microscopie electronică de voltaj supraînalt (la mărimi de 300.000 X). Microtrabeculele ar forma o rețea ce străbate întreaga hialoplasmă, în ochiurile rețelei găsindu-se apă și ioni. Microtrabeculele cu diametrul de circa 4—6 nm ar menține suspendate în interiorul citoplasmei atît organitele celulare cît și citoscheletul. Mai mult, de microtrabecule s-ar afla legate și enzimele din citosol (de pildă din glicoliză), ceea ce ar asigura trecerea substratului de la o enzimă la alta în mod coordonat.

Microtrabeculele ar avea și alte roluri. Unul ar fi acela de a proteja celula în cazul fluctuațiilor conținutului de apă. Atunci cînd apa pătrunde în celulă spațiile dintre microtrabecule se dilată, dimpotrivă, la deshidratarea celulei spațiile se contractă. În acest fel, s-ar asigura viabilitatea celulei. Alt rol al rețelei de microtrabecule ar fi acela de a determina mișcarea granulelor de pigment din *eritrofori*. Experimental s-a obținut dispersarea sau adunarea granulelor de pigment în cîteva secunde, procesul de dispersare consumînd ATP.

Asupra microtrabeculelor există în prezent controverse, similare cu cele din secolul trecut, cînd aspectele fibroase observate în citoplasmă la microscopul optic erau atribuite artefactelor de fixare (vezi discuția în ref. Kondo, 1984).

E. Macovschi (1981, 1984) identifică microtrabeculele cu suportul materiei biostructurale.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVA

1. Brinkley B. R., Summary: *Organization of the Cytoplasm*, in: Cold Spring Harbor Symposia, Quant. Biol., Vol. XLVI, pp. 1029—1040, 1982.
2. Brinkley B. R., The Cytoskeleton: A Perspective, in *Methods in Cell Biology*, Vol. 24, pp. 2—8, Academic Press, New York, 1982.

5. BAZELE MOLECULARE ALE MOTILITĂȚII CELULARE

Mișcările celulare (sau motilitatea) sînt proprietăți de bază ale celulei, de altfel mișcarea fiind o caracteristică a materiei vii; numai atunci cînd se produce moartea celulei dispar și mișcările biologice și rămîne doar mișcarea browniană, care este un fenomen fizic.

Mișcările celulare sînt extrem de variate. În general putem distinge trei categorii de mișcări (Tabel nr. 5.1.) după cum sînt sau nu modificate raporturile celulei cu mediul, iar contracția musculară constituind o categorie aparte. În esență însă, modificările de formă și mișcările celulare se datoresc acțiunii la nivel molecular a două *sisteme motile de bază*: sistemul actină-miozină și sistemul microtubul-dineină.

5.1. MIȘCĂRI CELULARE AVÎND LA BAZĂ SISTEMUL ACTINĂ-MIOZINĂ

Sistemul actină-miozină explică în primul rînd mecanismul molecular al contracției musculare, dar se consideră în prezent că și în celulele nemusculare interacțiunile actină-miozină au loc după același mecanism molecular, a cărui esență este următoarea. Între filamentele paralele de

Tabel 5.1. Categoriile de mișcări celulare și sistemul molecular ce asigură motilitatea

Categoriile de mișcări celulare	Sistemul molecular motil de bază
1. Mișcările din timpul contracției musculare	actină-miozină
2. Mișcări ce modifică raporturile dintre celulă și mediul extern : a) mișcarea de locomoție ameboidală b) mișcarea de locomoție cu ajutorul flagelilor c) mișcarea cililor	actină-miozină microtubul-dineină microtubul-dineină
3. Mișcări ce nu modifică pozițiile reciproce ale celulei și ale mediului extern (mișcări intracelulare) : a) mișcările din cursul diviziunii celulare b) mișcările din microvilli c) curenții citoplasmatici	microtubul-dineină actină-miozină actină-miozină, microtubul-dineină

actină și miozină se stabilesc punți laterale între capetele globulare de miozină și moleculele de actină de pe filamentele respective. Contrakția este explicată prin alunecarea filamentelor de actină și miozină unul peste altul (fig. 5.1.). Pentru aceasta se desface puntea dintre miozină și o actină și se restabilește puntea cu monomerul următor, din filamentul de actină. În acest fel noua moleculă de actină ocupă poziția actinei cu care s-a desfăcut puntea și deci filamentul se deplasează. Energia necesară este furnizată de hidroliza ATP. Deplasarea este comparată cu mecanismul „roții de clichet”. Relaxarea este produsă prin desfacerea simultană a tuturor punților dintre filamentele de actină și miozină, ceea ce permite glisarea filamentelor.

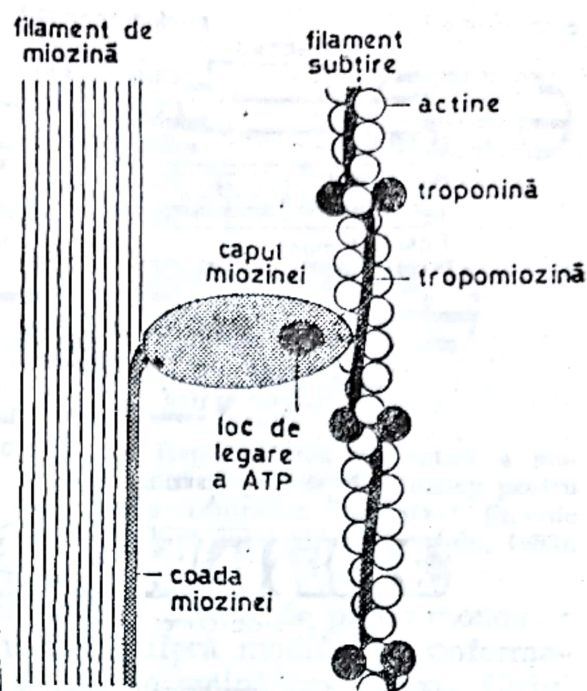


Fig. 5.1. Sistemul molecular motil actină-miozină (după Sheeler și Bianchi, 1980).

5.1.1. CONTRACȚIA MUSCULARĂ

Este forma „clasică” de mișcare avînd la bază sistemul actină-miozină; se poate spune chiar cea mai perfecționată, considerînd celelalte mișcări celulare ce au la bază același mecanism ca fiind forme „rudimentare” întîlnite în toate celulele, în timp ce contracția musculară aparține unor structuri specializate din mușchii scheletici, mușchiul cardiac și mușchii netezi.

Mușchii scheletici constau din *fibre musculare*, fiecare fibră putînd fi considerată o celulă neobișnuit de mare, formată prin fuziunea multor celule individuale și tocmai de aceea conținînd mulți nuclei. Circa două treimi din masa fibrei o constituie *miofibrilele*, elemente cilindrice cu diametrul de 1—2 μm ce străbat întreaga lungime a celulei. Fiecare miofibrilă este compusă dintr-un șirag de unități contractile mici, cu lungimea de circa 2,5 μm , numite *sarcomere* (fig. 5.2.).

Miofibrila are în lungimea sa benzi întunecate și benzi luminoase. Cum pe toate miofibrilele dintr-o fibră benzile întunecoase și luminoase sînt dispuse la același nivel, mușchiul scheletic apare striat. Benzile întunecate se numesc *benzi A* (anizotropice, fiindcă apar birefringente în lumină polarizată), iar cele luminoase sînt *benzile I* (izotropice, care nu modifică lumina polarizată). *Banda A* este traversată prin mijlocul ei de o bandă subțire luminoasă (împărțită uneori în două printr-o linie întunecată numită linia M). *Banda I* este străbătută la mijlocul ei de o

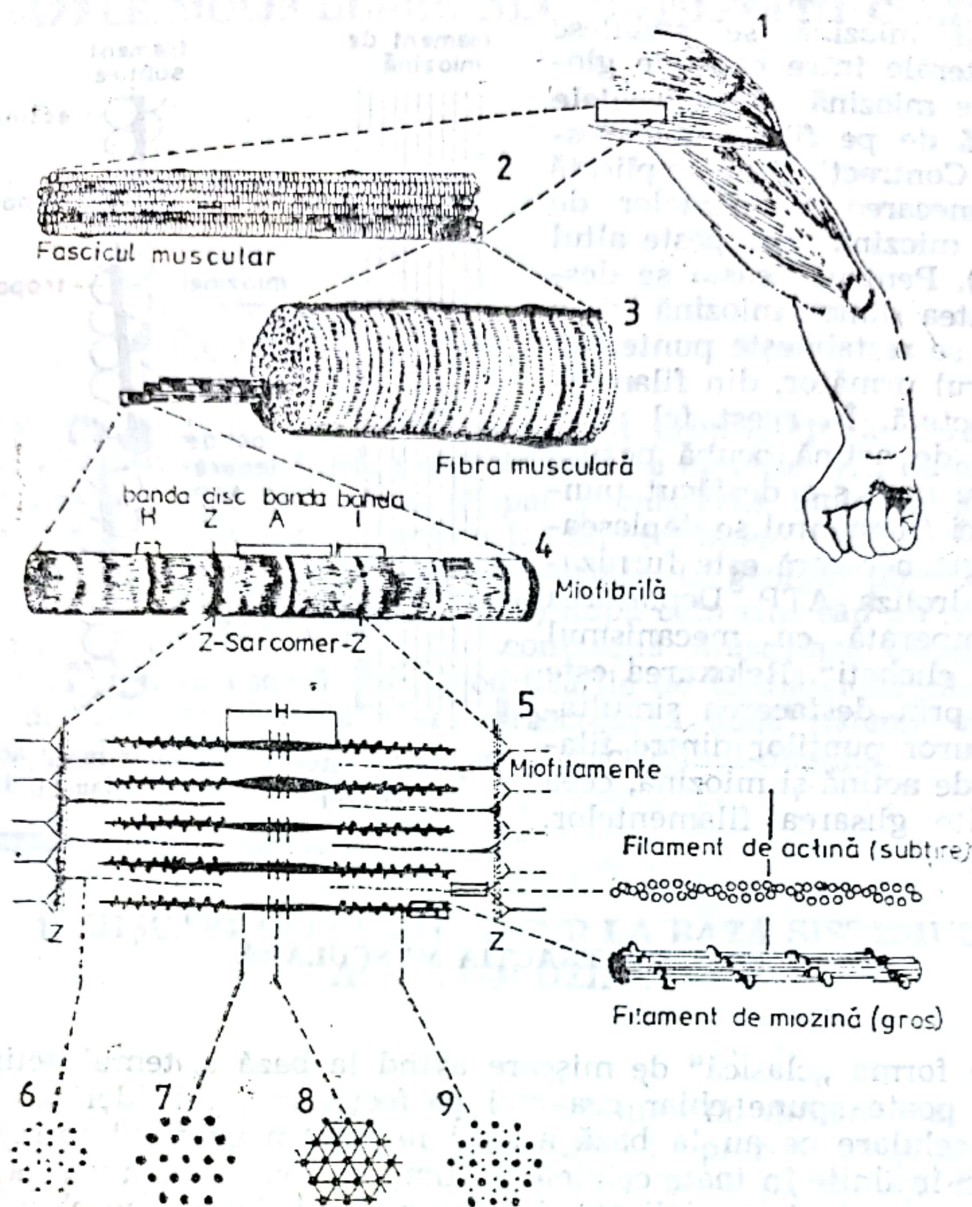


Fig. 5.2. Diagramă ilustrând structura și poziția filamentelor subțiri (de actină) și groase (de miozină) din mușchi (modificat după Junqueira și colab., 1983).

linie întunecată, numită *linia Z* (sau *discul Z*). Unitatea contractilă a miofibrilei, *sarcomerul*, se întinde de la o linie Z la următoarea linie Z, în lungul miofibrilei. Structura sarcomerului a fost elucidată prin microscopie electronică încă din 1953, fiind una din primele aplicații ale microscopiei electronice în biologie. Fiecare sarcomer constă dintr-o aranjare paralelă și parțial suprapusă a *filamentelor groase* (de miozină, lungi de $1,6 \mu\text{m}$ și cu diametrul de 15 nm) cu *filamentele subțiri* (de actină, lungi de $1 \mu\text{m}$ și cu diametrul de 8 nm). Banda A conține în centrul său numai filamente de miozină, iar la capete are și filamente de actină intercalate. Banda I are numai filamente de actină. Contractia musculară se produce prin *glisarea* (alunecarea) filamentelor subțiri pe lângă cele groase, fără a se modifica lungimile lor (modelul glisării, pro-

pus de Huxley în 1954, demonstrat experimental pe mai multe căi și redat în fig. 5.3.). Această glisare duce la scurtarea lungimii sarcomerului, iar sumarea scurtării tuturor sarcomerelor duce la scurtarea fibrei musculare. De pildă, o scurtare a sarcomerului de la 2,5 μm la 2 μm (deci cu 20%) sumată pentru 20.000 sarcomeri duce la scurtarea lungimii fibrei musculare de la 5 cm la 4 cm. Este clar că se scurtează doar banda I, pe când cea întunecată (A) nu se modifică.

Glisarea se datorează tocmai intervenției mecanismului molecular actină-miozină, în care fiecare cap de miozină „pășește” în lungul filamentului de actină, de pe un monomer pe următorul. Capul moleculei de miozină suferă modificări conformaționale ciclice, prin care „trage” filamentul de actină pas cu pas. Ciclul acestor modificări este următorul (fig. 5.4.).

Capul de miozină, ce are pe el ADP-ul și fosfatul anorganic de la hidroliza precedentă a ATP-ului ajunge în vecinătatea unui monomer de actină printr-o mișcare de difuziune produsă la întâmplare, permisă de flexibilitatea regiunii de legătură dintre capul și coada lanțului greu al moleculei de miozină. În momentul în care capul miozinei atinge actina, este eliberat ADP-ul și la fel și fosfatul anorganic, ceea ce determină o modificare conformațională a capului miozinei, cu încovoierea lui și prin

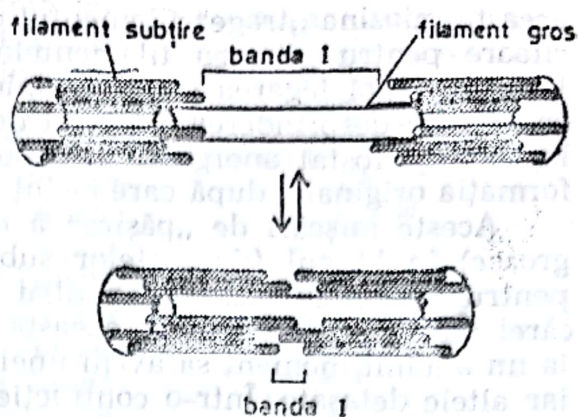


Fig. 5.3. Reprezentarea schematică a modelului glisării propus de Huxley pentru a explica contracția musculară (figurile 5.3—5.8. sînt după Alberts și colab., 1983).

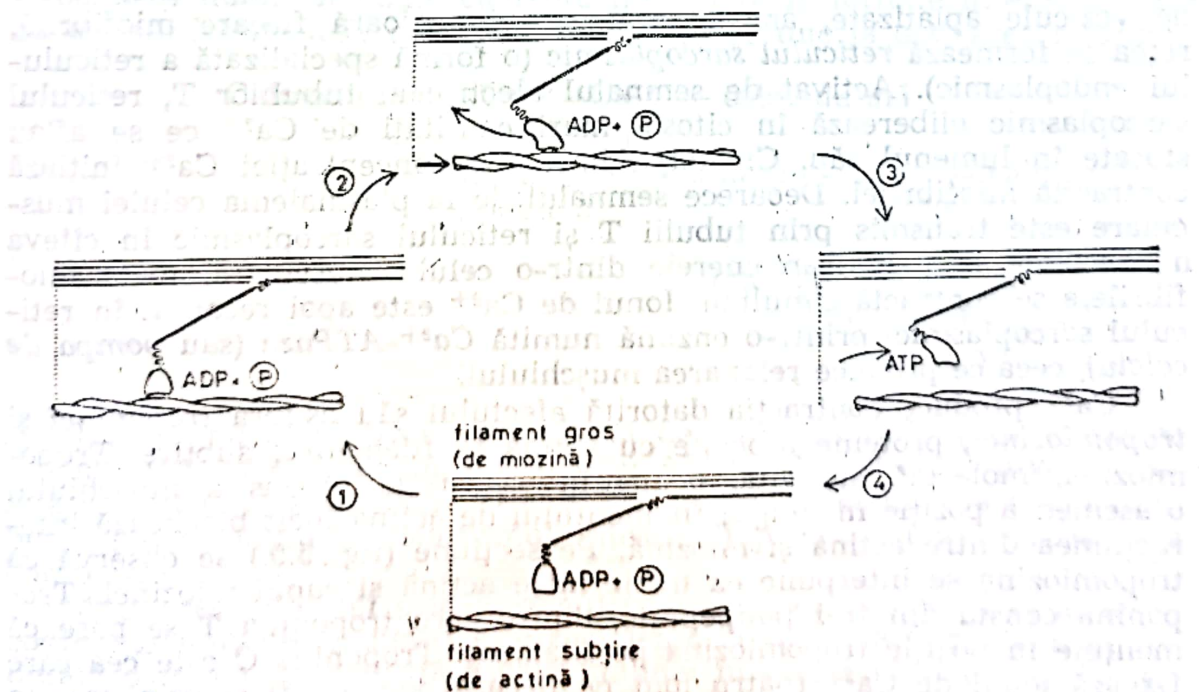


Fig. 5.4. Diagrama funcționării sistemului actină-miozină (descrierea în text).

aceasta miozina „trage” filamentul de actină. Aceasta este mișcarea hotărâtoare pentru glisarea filamentelor deci pentru contracția musculară. Urmează apoi legarea de capul miozinei a unei molecule de ATP, ceea ce duce la desprinderea miozinei de actină. Miozina hidrolizează ATP-ul la ADP și fosfat anorganic și capul de miozină își recapătă astfel conformația originală, după care ciclul se repetă.

Aceste mișcări de „pășire” a capetelor de miozină (din filamentele groase) în lungul filamentelor subțiri (de actină) se produc individual pentru fiecare moleculă și pentru fiecare din cele două capete ale fiecărei molecule de miozină; aceasta face ca într-un mușchi în contracție la un anumit moment să avem unele capete de miozină atașate de actină, iar altele detașate. Într-o contracție rapidă fiecare din cele circa 500 capete de miozină ale unui filament gros parcurge ciclul descris de circa 5 ori pe secundă. Evident că o elasticitate a moleculei de miozină este esențială pentru mișcare.

Pe lângă actină și miozină în miofibrile se mai găsesc alte proteine accesorii. Unele au rol structural. De pildă în discul Z se găsesc *α -actinina* și *desmina*, proteine ce ancorează filamentele de actină în discul Z și, respectiv, aliniază miofibrilele adiacente. Deci, pe de o parte se leagă cap la cap sarcomerele, iar pe de altă parte se asigură contracția „în paralel” a miofibrilelor.

Alte proteine accesorii au rol predominant funcțional, de a media efectul pe care îl are ionul de Ca^{2+} în contracția musculară. Contracția mușchiului scheletic se produce în momentul în care excitația nervului motor al mușchiului declanșează un potențial de acțiune în plasmalema celulei musculare (la nivelul joncțiunii neuro-musculare). Semnalul electric se transmite rapid în jurul fiecărei miofibrile printr-un sistem de tubuli (numiți *tubuli transversi* sau I) ce se întind de la plasmalemă la fiecare miofibrilă. Aici semnalul electric este transferat unei rețele de vezicule aplatizate, anastomozate, ce înconjoară fiecare miofibrilă, rețea ce formează *reticulul sarcoplasmic* (o formă specializată a reticulului endoplasmic). Activat de semnalul electric al tubulilor T, reticulul sarcoplasmic eliberează în citosol mari cantități de Ca^{2+} ce se aflau stocate în lumenul său. Creșterea bruscă a concentrației Ca^{2+} inițiază contracția miofibrilei. Deoarece semnalul de la plasmalema celulei musculare este transmis prin tubulii T și reticulul sarcoplasmic în câteva milisecunde la toate sarcomerele dintr-o celulă musculară, toate miofibrilele se contractă simultan. Ionul de Ca^{2+} este apoi recaptat în reticulul sarcoplasmic, printr-o enzimă numită *Ca^{2+} -ATPaza* (sau *pompa de calciu*), ceea ce produce relaxarea mușchiului.

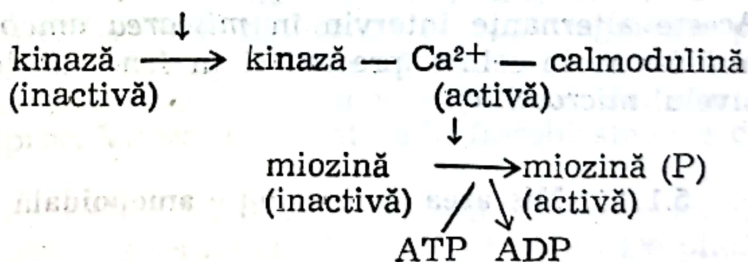
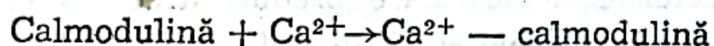
✕ Ca^{2+} produce contracția datorită efectului său asupra *troponinei* și *tropomiozinei*, proteine asociate cu actina în filamentul subțire. Tropomiozina, moleculă alungită, ocupă în starea de repaus a mușchiului o asemenea poziție în lungul filamentului de actină încât blochează interacțiunea dintre actină și miozină. Pe secțiune (fig. 5.5.) se observă că tropomiozina se interpune ca un ic între actină și capul miozinei. Troponina constă din trei polipeptide, dintre care troponina T se pare că menține în poziție tropomiozina pe filament. Troponina C este cea care fixează ionul de Ca^{2+} (patru ioni pe fiecare polipeptid) și prin aceasta modifică poziția tropomiozinei. Acuma devine posibilă interacțiunea ac-

tinei cu miozina. Deci troponina și miozina „răspund” la creșterea concentrației Ca^{2+} în citosol indusă de eliberarea Ca^{2+} din rețiculul sarcoplasmic.

Mușchiul cardiac are și el striatii și o aranjare foarte asemănătoare a filamentelor de actină și miozină ca și mușchiul scheletic.

Mușchiul neted nu are striatii. El constă din celule musculare fusiforme, avînd un singur nucleu și conținînd filamentele groase și subțiri aliniate paralel cu axa lungă a celulei. Dar filamentele nu formează aici miofibrile și nu sînt aranjate strict ordonat ca în mușchii striati. Miozina din celula mușchiului neted se deosebește în două privințe de miozina din mușchiul striat: 1) activitatea ATP-azică este de zece ori mai mică față de cea a miozinei din mușchiul scheletic și este mult mai direct reglată de Ca^{2+} ; 2) miozina din mușchiul neted nu poate interacționa cu actina decît dacă lanțurile sale ușoare sînt fosforilate; dacă acestea sînt defosforilate miozina nu poate interacționa cu actina și mușchiul se relaxează.

Fosforilarea și defosforilarea lanțurilor ușoare ale miozinei din mușchiul neted sînt efectuate de enzime specifice. Enzima de fosforilare se numește *kinaza lanțurilor ușoare ale miozinei* și este activată de complexul Ca^{2+} cu calmodulina. Numai astfel activată kinaza fosforilează miozina și numai miozina cu lanțurile ușoare fosforilate interacționează cu actina. Există deci o cascadă de reacții ce duc la activarea miozinei:



Kinaza miozinei poate fi activată de influxul Ca^{2+} prin excitarea sistemului nervos autonom, dar și prin AMP ciclic, al cărui nivel în celulă este reglat de hormoni. Deci astfel se produc contracția mușchiului neted (de exemplu peristaltismul intestinal) prin acțiune nervoasă sau hormonală.

Activarea miozinei prin sistemul calmodulinei este lentă și la fel și contracția mușchiului neted este mai lentă. Troponina C poate fi considerată o formă specializată a calmodulinei în mușchiul striat, unde este necesară o contracție rapidă.

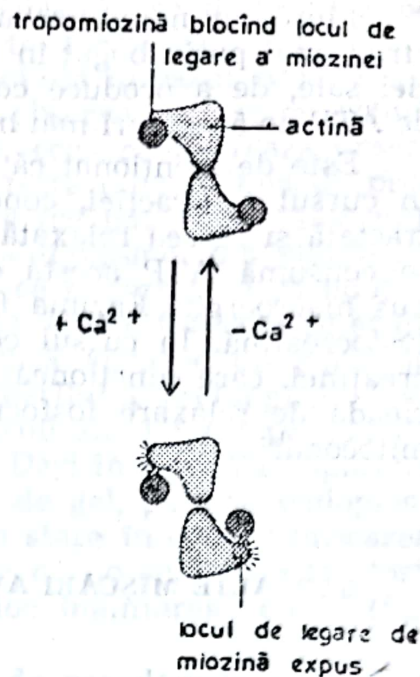


Fig. 5.5. Secțiune transversală prin filamentul subțire arătînd deplasarea tropomiozinei sub influența Ca^{2+} .

Mușchiul neted trebuie considerat nu ca o „rudă săracă” a celui striat, mai puțin bogat în filamente, ci ca o celulă perfect adaptată funcției sale, de a produce contracție lentă, de durată lungă și cu consum de ATP de 5—10 ori mai mic decât mușchiul striat.

Este de menționat că deși mușchiul striat consumă foarte mult ATP în cursul contracției, concentrația de ATP este aceeași în starea contractată și în cea relaxată a mușchiului. Aceasta deoarece pe măsură ce se consumă ATP acesta este regenerat din *fosfocreatină*, un alt compus macroergic. Enzima fosfocreatin-kinază reface ATP-ul din ADP și fosfocreatină. În cursul contracției musculare scade concentrația fosfocreatinei, care funcționează ca o „baterie reîncărcabilă”, deoarece în perioada de relaxare fosfocreatina se reface din ATP-ul nou generat de mitocondrii.

5.1.2. ALTE MIȘCĂRI AVÎND LA BAZA SISTEMUL ACTINĂ-MIOZINA

Miozina din toate celulele nemusculare se aseamănă cu cea din mușchiul neted prin faptul că activarea ei (dobîndirea capacității de a se lega de actină) depinde de fosforilarea lanțurilor ușoare, care la rîndul ei este stimulată de sistemul Ca^{2+} — calmodulină. Fosforilarea induce asamblarea miozinei în agregatele mici bipolare formate din 10—20 molecule de miozină (fig. 4.4.). Dar chiar și un număr mic de molecule de miozină legate prin cozile lor pot realiza deplasarea unor filamente de actină, după mecanismul molecular al sistemului actină-miozină. Aceasta se vede din fig. 5.6.

Asemenea deplasări stau la baza celorlalte mișcări avînd la bază sistemul actină-miozină, întîlnite în celulele nemusculare. Contracția actomiozinei în celulele nemusculare produce trecerea citoplasmei în starea de gel, pe cînd relaxarea ei produce trecerea în stare fluidă. Aceste alternanțe intervin în *mișcarea ameboidală de locomoție*, întîlnită la unele celule, precum și în fenomenele de motilitate întîlnite la nivelul *microvililor*.

5.1.2.1. Mișcarea de locomoție ameboidală

Mișcarea ameboidală este o formă de locomoție întîlnită nu numai la protozoare (exemplul clasic fiind *Amoeba proteus*), ci și la metazoare și la om. Are importanță medicală deosebită deoarece prin acest mecanism leucocitele părăsesc vasele sanguine și se deplasează la locul unei



Fig. 5.6. Reprezentarea schematică a glisării a două filamente de actină de polaritate opusă, sub acțiunea unui agregat bipolar din molecule de miozină (explicarea mișcărilor din celule nemusculare).

infecții în organism; pe de altă parte, fibroblastele se deplasează pe suprafața rănilor depunând collagen, cu rol în formarea cicatricii.

Mișcarea ameboidală este cel mai bine studiată în cazul Amoebelor, care pot atinge 0,5 mm în diametru și pot fi observate chiar cu ochiul liber. Mișcările Amoebei sînt și foarte rapide, ceea ce ușurează observarea lor. Amoeba se mișcă prin emiterea și retracția continuă de prelungiri de formă cilindrică numite *pseudopode* (ce pot atinge 100 μ m). Mișcările se bazează pe treceri succesive ale citoplasmei din starea de gel în cea fluidă și reciproc. Astfel, pe măsură ce se formează pseudopodul, citoplasma din centrul celulei (endoplasma) devine fluidă și se scurge în pseudopode prin centrul acestora. Ajunsă aproape de periferia pseudopodului, citoplasma se răstoarnă spre periferia prelungirii și se gelifică prin contracția actomiozinei. Pseudopodul fiind fixat pe suport, corpul celulei este tras pe direcția prelungirii. Deci în esență ectoplasma (foarte groasă în cazul Amoebei) este în stare de gel, pe cînd endoplasma în stare de sol. Trecerile succesive dintr-o stare în alta și mișcarea citoplasmei descrisă mai sus au fost comparate cu „o șenilă de tractor” și prin aceste deplasări ale citoplasmei are loc înaintarea celulei (fig. 5.7.).

În cazul vertebratelor și la om emiterea de pseudopode are loc la mișcarea leucocitelor, dar în acest caz pseudopodele sînt mai mici și mișcările sînt mai lente.

În cazul fibroblastelor, care sînt de circa 10 ori mai mici decît Amoeba și au mișcări mai lente, mișcările s-au studiat în special în culturi de celule, prin microcinematografiere (fotografierea imaginii la diferite intervale de timp) sau prin înregistrare video. Fibroblastul emite pe direcția mișcării prelungiri lătite numite *lamelipode* care alcătuiesc o muchie de înaintare. Din lamelipode proemină niște vîrfuri ascuțite ca niște țepi sau lănci. Procesul de emitere a acestor prelungiri este continuu, unele prelungiri aderînd la substrat pe fața ventrală prin *plăci de adeziune*, în timp ce alte prelungiri se reîntorc spre corpul celulei pe fața dorsală formînd *ondulații de suprafață*. Pe măsură ce are loc înaintarea celulei, la spatele ei rămîne o coadă în interiorul căreia se găsesc *fibrelle de retracție*, ba chiar din coadă se rup fragmente pe care celula le lasă în urmă (fig. 5.7.) Se admite că și la mișcarea fibroblastelor se produc aceleași treceri succesive ale citoplasmei din starea de gel în cea de sol și reciproc. Viteza de înaintare la fibroblaste este de circa 40 μ m pe oră.

Mișcarea ameboidală nu se face la întîmplare. Fibroblastele manifestă o preferință marcată pentru suprafețele de care pot adera. De pildă, dacă pe o suprafață există o zonă de sticlă sau plastic și o zonă cu metal, fibroblastele se deplasează pe zona metalică. Este posibil ca prelungirile subțiri, țepii de pe lamelipode, să acționeze ca niște „antene de pipăire” a suprafeței. De asemenea forma suprafeței este importantă. Dacă sînt plasate pe suprafața unui cilindru de sticlă fibroblastele se aliniază în lungul cilindrului, deci migrează pe direcția curburii minime.

Adeseori emiterea prelungirilor și deplasarea celulei se face spre direcția unui stimul chimic; mișcarea direcționată astfel se numește *chemotactism*. Pe această bază Amoeba își găsește hrana, iar leucocitele se acumulează la locul infecției (putînd fi atrase de peptidele rezultate

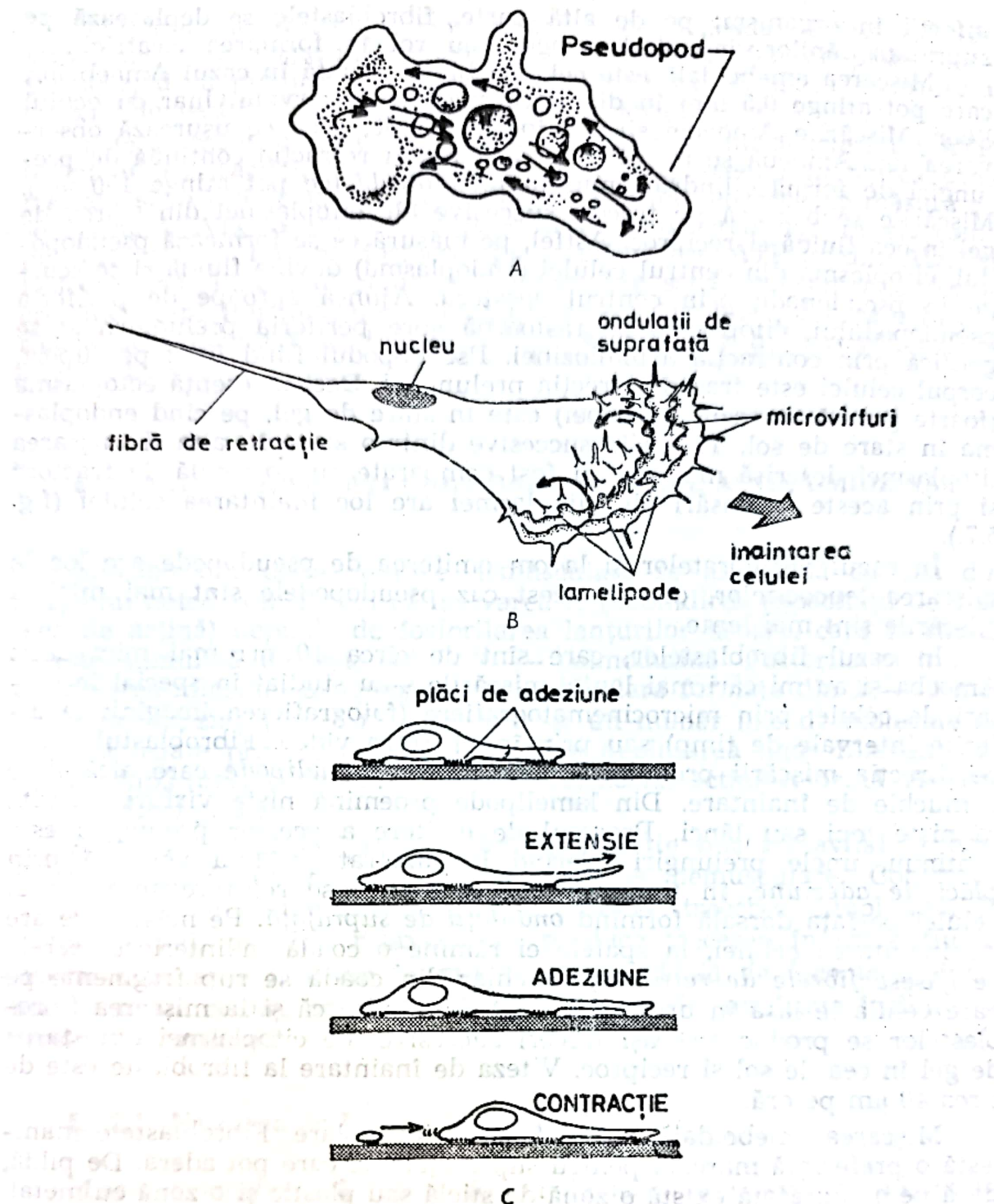


Fig. 5.7. Mișcarea ameboidală: A: în cazul Amoebei. B: în cazul fibroblastului; C: locomoția fibroblastului pe o suprafață.

din proteinele serice care alcătuiesc complementul). Mecanismul de coordonare a emiterii de prelungiri pe direcția mișcării nu este încă elucidat.

Chemotactismul este o proprietate ce se întâlnește și la bacteriile ce se deplasează prin flageli, cum este și *E. coli*; (s-a menționat că bacteriile nu prezintă mișcări ameboidale). Observațiile asupra chemotac-

tismului la bacterii au dus la descoperirea unor mutante nechemotactice, care nu pot răspunde la unii stimuli chimici. Studiul acestor mutante a dus la identificarea unui mecanism molecular al răspunsului chemotactic. Transmiterea semnalelor chemotactice prin plasmalemă se datorează unor proteine ce străbat membrana și care, în cursul răspunsului chemotactic, devin metilate; acestea se numesc *proteinele chemotactice acceptoare de metil* („methyl-accepting chemotaxis proteins“, MCPs). Metilarea lor se face prin transferul unui metil de pe S-adenozilmetionină pe o grupare carboxil liberă dintr-un rest de acid glutamic, reacție catalizată de o metil transferază. Reacția se produce pe fața citoplasmatică a proteinelor MCPs în momentul când pe fața externă se leagă o moleculă de „attractant“ (substanță ce atrage celula pe o direcție). În momentul în care attractantul este îndepărtat se produce îndepărtarea grupărilor metil de pe MCPs prin enzima metil esterază.

Recent s-au adus dovezi că și în cazul leucocitelor atrase la locul infecției de molecule specifice „attractante“ eliberate în focarul inflamator se produce metilarea unor grupări carboxil din proteinele de membrană în momentul când are loc legarea „attractantului“. Dacă metilarea este blocată cu anumite substanțe, atunci și la leucocite, ca și la bacterii chemotactismul este inhibat.

5.1.2.2. Mișcările din microvili

Microvili sînt expansiuni permanente mici pe suprafața unor celule cu funcție de absorbție: celulele intestinului subțire, ale tubului contort proximal în rinichi, hepatocitele și altele. Microvili măresc suprafața de absorbție, dar pe lângă aceasta intervin și activ, împingînd substanțele absorbite spre interiorul celulei. Aceasta se realizează prin contracția microfilamentelor de actină și a filamentelor de miozină aflate la interiorul microvilului.

Mărirea suprafeței este considerabilă. De exemplu microvili de pe suprafața unei celule intestinale, ce alcătuiesc așa numita „margine în perie“, cresc de circa 25 ori suprafața de absorbție.

În interiorul unui microvil există circa 40 filamente de actină aranjate paralel, avînd toate aceeași polaritate și care se termină la capătul microvilului într-o regiune amorfă cu compoziție insuficient precizată, ce setabilește legătura filamentelor cu membrana. La polul bazal filamentele de actină din microvil se termină într-o rețea perpendiculară de filamente de actină numită și „butonul terminal“. Aceasta conține și miozină și are probabil funcția de a menține în poziție microvilul. Polaritatea filamentelor de actină din microvil este analoagă cu cea a filamentelor subțiri din sarcomer (fig. 5.8.). Mănușchiul de filamente din microvil mai este legat din loc

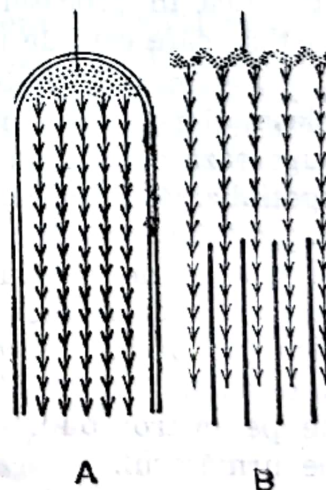


Fig. 5.8. Reprezentarea schematică a polarității filamentelor de actină în microvil (A) și în sarcomerul din mușchi (B).

în loc și prin *fimbrină* și are și legături cu plasmalema din zona laterală a microvilului (legături ce realizează „o scară” cu treptele dispuse în spirală în lungul microvilului).

5.1.2.3. Curenții citoplasmatici

Curenții citoplasmatici sînt mișcări intracelulare ce realizează o deplasare a organitelor și a componentelor citoplasmatiche în celulă. Se pot întîlni sub diferite forme. Astfel, chiar scurgerea citoplasmei fluidificate în prelungirile celulelor în cursul mișcării ameboidale reprezintă un curent citoplasmatic. S-a amintit și de *mișcarea saltatorie* a organitelor celulare. Există apoi uneori o mișcare celulară în jurul nucleului, mișcare numită *cicloză*, vizibilă în special în celulele vegetale sau în alge verzi unicelulare.

Mecanismul molecular al curenților citoplasmatici nu este încă elucidat. În cazurile de mai sus se pare că sistemul molecular actină-miozină joacă rolul principal, deoarece citocalazinele opresc curenții citoplasmatici. S-a propus ideea că pe filamentele de actină situate la periferia celulei se deplasează filamente de miozină care au legate pe ele organele celulare (Alberts și colab. 1983). În orice caz curenții citoplasmatici sînt caracteristici celulei eucariote vii, ei dispar la moartea celulei. Aceste mișcări trebuie deosebite de *mișcarea browniană*, fenomen fizic rezultînd din bombardarea particulelor din citoplasmă de către moleculele dizolvate. Curenții citoplasmatici reprezintă un fenomen biologic. Viteza lor este influențată de lumină, pH, căldură și este mai mare în celulele mai active metabolic. Deși în aparență neregulați, curenții citoplasmatici asigură pe bază statistică contactul organitelor din celulă cu diferitele substanțe din citoplasmă. Este un exemplu de cauzalitate statistică în procesele celulare (spre deosebire de cauzalitatea deterministică, care este de tip cauză-efect).

Pe lîngă mecanismul actină-miozină în unele forme de curenți citoplasmatici un rol important se pare că revine microtubulilor, după cum sugerează cercetarea *transportului axoplasmic*. Acesta reprezintă o formă specializată de curenți citoplasmatici, prin care se realizează transportul organitelor celulare, a veziculelor sinaptice și a proteinelor din corpul celular al neuronului spre periferia axonului sau invers. S-au evidențiat brațe de legătură între microtubulii din axon și organele transportate (de pildă mitocondrii). Așa cum dineina catalizează o deplasare a unui tubul față de altul în cili și flageli, este posibil ca dineine similare de pe microtubulii citoplasmatici să „paseze” organitul de pe un braț pe următorul. În acest fel s-ar putea produce deplasarea organitelor în unii curenți citoplasmatici. S-a mai propus și faptul că microfilamentele și filamentele groase pot să aibă rol în determinarea curenților citoplasmatici.

5.2. MIȘCĂRI CELULARE AVÎND LA BAZĂ SISTEMUL MICROTUBUL-DINEINĂ; MIȘCĂRILE CILILOR ȘI FLAGELILOR

Dacă în microvili și în prelungirile celulare temporare mobile, cum sînt pseudopodele, lamelipodele și țepii lor, undulațiile de suprafață, rolul principal îl au filamentele de actină, în schimb în prelungirile mai mari cu caracter permanent, cum sînt cili și flagelii, baza structurii o formează microtubulii.

Cili mobili nu fac parte din aceeași clasă de organite cu stereocilii (cili ficși din urechea internă și epididim), în care, așa cum s-a menționat, nu există microtubuli, ci un mănuchi de filamente de actină. De asemenea flagelii de la eucariote nu trebuie confundați cu cei de la procariote, care au o structură total diferită.

Cili și flagelii sînt variante ale aceleiași organelor, avînd un mecanism molecular de mișcare identic. Se deosebesc însă în cîteva privințe. Cili sînt prelungiri multiple pe suprafața unor celule cum sînt cele de pe mucoasa aparatului respirator sau din oviduct, pe cînd flagelul este unic la spermatozoid, singura celulă flagelată de la om. Cili au mișcări ciclice în doi timp (bătaie-revenire), ca un bici, pe cînd flagelul are o mișcare ondulatorie sinusoidală (sau elicoidală). (fig. 5.9.).

Fiecare cil execută o mișcare de bătaie activă, în care cilul este perfect întins și exercită o forță maximă asupra lichidului înconjurător, urmată de o mișcare mai lentă, de revenire la poziția inițială. Fiecare ciclu durează 0,1—0,2 secunde. Cili de pe suprafața unei celule se mișcă în mod coordonat, astfel că mișcarea se propagă în valuri succesive, ca „într-un lan de grîu bătut de vînt”. Prin această mișcare coordonată se realizează împingerea unor materiale din mediul extern într-o direcție bine determinată, de exemplu eliminarea materialelor din căile respiratorii, antrenate în stratul de mucus deplasat de cili pe suprafața celulelor mucoasei. La fel se deplasează oul în oviduct.

Cilul este format din trei părți: porțiunea liberă sau cilul propriu-zis, corpul bazal și rădăcinile. Ultimele două porțiuni se află în citoplasmă. Corpul bazal are o structură identică cu a centriolului și este centrul coordonator al mișcării cilului. Rădăcinile au o structură variată și realizează ancorarea cilului de celulă.

Partea liberă a cilului este formată dintr-un complex de structuri microtubulare numit *axonemă* îmbrăcat în hialoplasmă și membrana

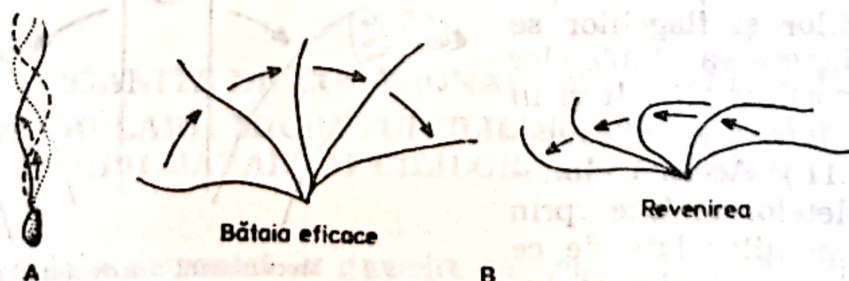


Fig. 5.9. Schema mișcării flagelului (A) și a cililor (B).

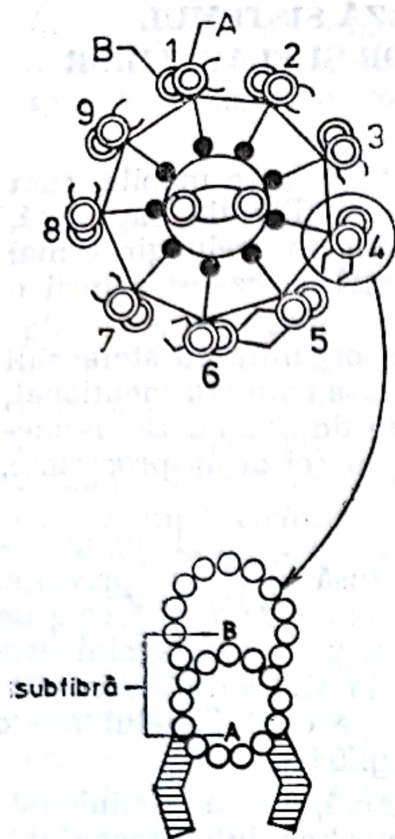


Fig. 5.10. Secțiune transversală prin axonema unui cil.

celulară. Axonema are un plan de organizare asemănător în toate celulele eucariote (fig. 5.10.). Există 9 dublete de microtubuli așezate în jurul a doi microtubuli individuali (așa-numita structură „9+2“). Fiecare dublet este format dintr-un microtubul complet numit subfibră A, (avînd 13 protofilamente), de care este atașat pe o parte un microtubul incomplet, numit subfibră B, (avînd 10 sau 11 protofilamente). Tubulinele alfa și beta ce formează subfibră A sînt diferite de tubulinele omoloage din subfibră B. De partea opusă subfibre B, se leagă de subfibră A două brațe în formă de clește, compuse dintr-o proteină numită *dineină*, care apar în lungul microtubului la intervale regulate de 24 nm. La intervale mai mari există din loc în loc și legături elastice între dubletele vecine formate din altă proteină numită *nexină*. De la subfibră A pleacă spre centrul axonemei cîte un braț de legătură (spîță) ce se termină într-o porțiune globulară în vecinătatea unei *teci interne* ce înconjoară cei doi microtubuli centrali. Deci privind lateral, între dublete precum și între dublete și microtubulii centrali există o serie de brațe laterale de legătură ce se repetă periodic în lungul axonemei.

Structura flagelului este asemănătoare cu a cilului, dar este mai complexă. Axonemia

flagelului este tot de tipul „9+2“, dar în jurul său se află o coroană de mitocondrii, ce asigură ATP-ul necesar mișcării.

Mecanismul molecular al mișcării cililor și flagelilor este același. Dineina, o proteină foarte mare compusă din mai multe polipeptide, cele majore avînd greutatea moleculară de 400.000, joacă un rol esențial, avînd proprietatea ATPazică. Scindarea ATP-ului furnizează energia necesară mișcării, funcția dineinei este deci similară cu a miozinei. ATP-ul provine din glicoliză sau din mitocondrii și difuzează prin citoplasmă în axonema cililor, pe cînd la flageli ATP-ul este generat în mitocondriile ce înconjoară axonema însăși. În timpul mișcării cililor și flagelilor se produce alunecarea dubletelor unul în raport cu celălalt și în consecință încovoierea axonemei (fig. 5.11.) Această alunecare a dubletelor se face prin deplasarea punților laterale ce se stabilesc între dineină și dubletul adiacent. La fel cum ac-

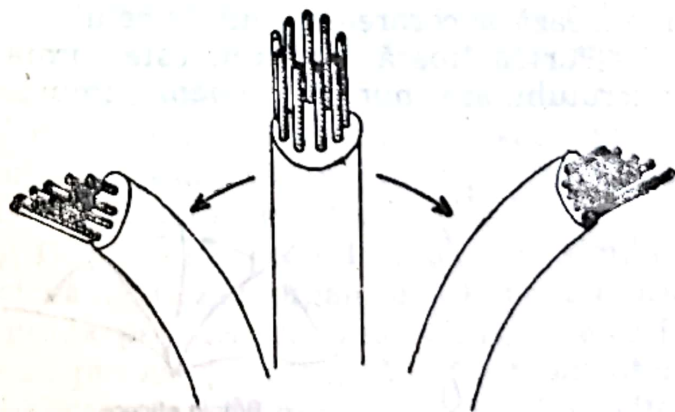


Fig. 5.11. Mecanismul încovoierii cilului sau flagelului prin glisarea dubletelor (reprezentate simplificat prin tubi) din axonemă.

tina era deplasată prin desfacerea punții de legătură cu miozina și refacerea punții cu actina din poziția adiacentă, tot așa în acest sistem se desfac și se refac legăturile dineinei cu dubletul adiacent; se realizează în consecință glisarea dubletelor unul față de celălalt și încovoierea cilului sau a flagelului.

Spîțele și teaca internă au rolul de a controla activitățile brațelor de dineină, astfel ca acestea să producă o undă coerentă de mișcare a cilului. Cu alte cuvinte structurile amintite reglează intrarea în acțiune a brațelor de dineină în mod coordonat, de la baza cilului spre vîrf, convertind mișcarea de alunecare a dubletelor într-o mișcare de încovoiere a cilului. La unii cili bătaia se produce în planul bisector al celor doi microtubuli centrali. Există mutante de *Chlamydomonas reinhardtii* (o algă unicelulară) la care lipsesc spîțele sau teaca internă și axonemele sînt imobile. Dacă însă se tratează axonemele cu enzime proteolitice, dubletele pot aluneca unele pe lîngă altele. Aceasta sugerează că activarea brațelor de dineină este în mod normal inhibată de alte proteine, iar spîțele și teaca internă îndepărtează inhibiția producînd și o activitate coordonată a brațelor de dineină.

Deoarece dineina joacă rol decisiv, absența ei la unii bolnavi cu *sindromul cililor imobili* (boală genetică descrisă recent) duce la infecții respiratorii (bronșite recurente, sinuzite cronice), din cauza incapacității cililor de a curăți căile respiratorii, și la sterilitate, din cauza imobilității spermatozoizilor. Deci dineina lipsește în acest caz în toate sistemele cu cili și flageli, iar axonema are structura profund alterată.

Este interesant că la circa jumătate din bolnavii cu sindromul cililor imobili există și *situs inversus*, adică asimetria normală a corpului (cu inima în stînga, ficatul în dreapta etc.) este inversată. În acest caz complexul de anomalii este numit *sindromul Kartagener*. S-a sugerat că bătaia unidirecțională a cililor în cursul dezvoltării embrionului uman joacă un rol în determinarea asimetriei normale stînga-dreapta a corpului.

Experiențe interesante la *Paramecium* au demonstrat că citoscheletul are o „memorie” ce se transmite la celulele descendente. Astfel, acest organism unicelular are pe suprafață rînduri de cili care toți bat în aceeași direcție. Dacă experimental se inversează bătaia a două rînduri de cili, acest caracter se transmite la toate celulele descendente după diviziune. Este o formă interesantă de ereditate care nu are nimica cu ADN-ul celulei, ci se transmite numai prin citoschelet.

5.3. ORGANITE DE COORDONARE A MOTILITĂȚII ȘI ASAMBLĂRII MICROTUBULILOR: CENTRIOLII ȘI CORPII BAZALI AI CILILOR ȘI FLAGELILOR

Microscopia electronică a dovedit că centriolii și corpii bazali au structură identică și deci pot fi considerate ca două variante, cu specialități diferite, ale aceleiași organele.

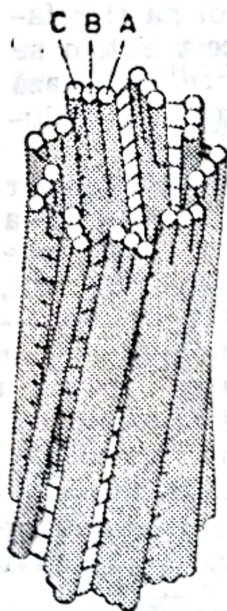


Fig. 5.12. Diagrama unui centriol.

La microscopul electronic centriolii și corpii bazali apar ca structuri cilindrice, cu lungimea de circa $0,3 \mu\text{m}$ și diametrul egal cu cel al axonemei ($0,1 \mu\text{m}$). La periferia cilindrului se află 9 triplete cu structură microtubulară (3 microtubuli înbrăcați într-o substanță densă); în schimb în centru nu se află microtubuli. Structura centriolului și a corpului bazal este deci de tipul „9+0”, față de „9+2” în axonema cililor și flagelului (fig. 5.12.).

Centriolii coordonează motilitatea celulară în special în timpul diviziunii celulare, pe când corpii bazali coordonează mișcările cililor și flagelilor.

Centriolii și corpii bazali au o funcție importantă și în organizarea polimerizării tubulinei și formarea microtubulilor. Astfel, centriolii induc formarea microtubulilor ce formează fibrele fusului de diviziune, iar corpii bazali formarea microtubulilor axonemei, din rezervorul de tubulină al citoplasmei. Așa se pot explica formarea și dispariția fusului de diviziune sau regenerarea unui flagel. De pildă alga *Chlamydomonas* are doi flageli. Dacă unul este rupt, celălalt se scurtează temporar până când se regenerează cel rupt. Este ca și cum din rezervorul comun tubulina „se scurge” dintr-un flagel în celălalt. De fapt corpul bazal al flagelului rămas coordonează depolimerizarea tubulinei din această axonemă, pe când corpul bazal al flagelului rupt coordonează asamblarea axonemei din tubulina ce i se pune la dispoziție. Este o reacție de urgență a celulei. După ce se sintetizează tubulină nouă, ambii flageli revin la dimensiunile normale.

Aceeași algă *Chlamydomonas* a mai servit și la demonstrarea faptului că centriolii și corpii bazali pot fi structuri interconvertibile. Astfel, la începutul mitozei, ambii flageli ai algei sînt resorbiți iar corpii bazali migrează în vecinătatea nucleului unde se așază perpendicular unul pe altul și organizează fusul de diviziune, deci devin centrioli. La sfîrșitul mitozei centriolii devin iarăși corpi bazali migrînd la periferia celulei și flagelii reapar.

Centriolul se află într-o structură mai complexă, descoperită încă din secolul trecut la microscopul optic și numită *centrul celular* sau *centrozom*. Acesta conține în mijloc doi centrioli așezați perpendicular unul pe altul, înconjurați de o masă de citoplasmă ca un nor, cu o compoziție încă insuficient precizată numită *material pericentriolar*. În interfază centrozomul se află situat în vecinătatea nucleului și din el pleacă microtubuli în toată citoplasma. În timpul fazei sintetice a ciclului celular (cînd are loc sinteza de ADN) începe dublarea centriolilor. Cei doi centrioli se separă și în vecinătatea fiecăruia se assemblează un centriol nou, perpendicular pe cel vechi. În cursul mitozei cele două perechi de centrioli se separă, migrează spre polii celulei, iar între ei se assemblează fusul de diviziune, format din mănunchiuri de microtubuli. În timpul mitozei cei doi centrozomi alcătuiesc polii fusului de diviziune, fiind fiecare format din centrioli, înconjurați de materialul pericentriolar din care

pleacă fibre radiare ce alcătuiesc *asterul*. Aceste fibre sînt și ele mă-nunchiuri de microtubuli ca și fibrele fusului de diviziune.

Funcția principală a centrozomului este aceea de *centru organizator al microtubulilor* (Porter, 1966). Materialul pericentriolar, format din proteine și probabil și din ARN (McIntosh, 1983), joacă rolul cheie în acest proces. Acest material determină polimerizarea tubulinei și asamblarea microtubulilor care au capătul (—) în centrozom și capătul (+), cu creștere rapidă, distal. Deci materialul pericentriolar inițiază asamblarea microtubulilor și o coordonează, iar microtubulii nu pleacă direct din centriol ci din acest material. Mai mult, există și centrozomi în care lipsesc centriolii, dar se păstrează capacitatea de a organiza microtubulii.

Prin funcția sa de organizator temporal, spațial și vectorial al microtubulilor, centrozomul este implicat în toate procesele prin care microtubulii apar ca „organizatori ai citoscheletului”, procese descrise la capitolul 4.3.4. Pe lângă aceasta i se atribuie centrozomului și un rol în direcționarea mișcărilor de locomoție ameboidală a fibroblastelor și leucocitelor. În toate acestea centrozomul se situează înaintea nucleului, pe direcția mișcării, deci probabil migrarea celulei pe substrat necesită un sistem de microtubuli emanînd de la centrozom. Dacă se tratează celula cu colcemid, atât în cazul fibroblastului, cît și al leucocitului, nu se inhibă mișcarea ameboidală, dar celula se mișcă la voia întîmplării, în toate direcțiile și nu mai păstrează mișcarea direcționată.

Aceste observații denotă că centrozomul joacă rol și în definirea polarității celulei. Polaritatea mai este evidențiată și de faptul că în celulele din epitelii centrozomul (ca și aparatul Golgi) se află dispus întotdeauna apical față de nucleu. În cazul că sistemul de microtrabecule se va dovedi general valabil pentru toate celulele, atunci și asocierea centrozomului cu rețeaua de microtrabecule, asociere descrisă de Luby și Porter (1982) în cazul migrării granulelor de pigment din eritrofore, ar putea să aibă semnificație mai generală.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Bereiter-Hahn J., Intracellular mobility of mitochondria: role of the inner compartment in migration and shape changes of mitochondria in XTH-cells, J. Cell Sci., 30, 99—115, 1978.
2. Luby K. L., Porter K. R., The control of pigment migration in isolated erythrocytes of *Holocentrus ascensis* (Osbeck), I. Energy requirements, Cell, 21, 13—23, 1980.
3. Palmblad J., Mossberg B., Afzelius B. A., Ultrastructural, cellular and clinical features of the immotile-cilia syndrome, Ann. Rev. Med., 35, 481—492, 1984.
4. Sundaralingham M. și colab., Molecular structure of troponin C from chicken skeletal muscle at 3-Angstrom resolution, Science, 227, 945—948, 1985.

6. BIOLOGIA MOLECULARĂ A MEMBRANELOR CELULARE

Studiul membranelor a devenit o parte importantă a biologiei celulare odată cu introducerea metodelor biochimice și histochimice, când s-au precizat funcțiile specifice diferitelor membrane. În sfârșit, odată cu introducerea metodelor fizice de studiere a membranelor (difracția razelor X, metode spectroscopice, calorimetrice) studiul membranelor devine un obiect central în biologia moleculară.

6.1. TIPURI DE MEMBRANE

Definiția membranelor biologice: sînt ansambluri compuse din proteine și lipide ce formează structuri continue bidimensionale (foițe) cu proprietăți caracteristice de permeabilitate selectivă, prin care se realizează compartimentarea materiei vii.

Se pot distinge cel puțin trei categorii de membrane celulare (fig. 2.2.):

1. *Membrana citoplasmatică* (plasmalema, membrana plasmatică) cu o grosime de circa 6—10 nm conferă individualitate celulei, separînd-o de mediul înconjurător (împiedică amestecarea citoplasmei cu acest mediu). În același timp plasmalema permite efectuarea schimbului de substanțe dintre celulă și exterior și servește la realizarea interacțiunilor celulei cu alte celule sau cu mediul extern. La plante și la unele bacterii plasmalema este dublată de o a doua barieră, *peretele celular*, cu o structură diferită la procariote față de eucariote.

2. *Membranele organitelor celulare* sînt mai subțiri, de circa 6 nm: a) *membrana nucleului* este dublă și prevăzută cu pori (se mai numește *înveliș nuclear*); b) *membranele reticulului endoplasmic* reprezintă o rețea de canale ce traversează întreaga celulă, ca un aparat circulator intracelular fiind compus din reticul neted și rugos (cu ribozomi atașați); c) *membrana aparatului Golgi*, format din saci turtiți, se află în relație de continuitate cu reticulul endoplasmic; d) *membrana dublă a mitocondriilor*; e) *membrana lizozomilor*; f) *membrana peroxizomilor*.

3. *Membrane speciale*: a) *teaca de mielină a nervilor* produsă de celula Schwann; b) *discurile suprapuse* ca un fișic de monede din segmentul extern al celulelor cu bastonaș din retină.

Funcțiile membranelor celulare, foarte variate, sînt indispensabile pentru viață:

1. Funcția de barieră este îndeplinită nu numai de plasmalemă ci și de membranele organitelor celulare, care compartimentează celula și asigură formarea unor spații pentru desfășurarea reacțiilor metabolice în condiții optime.

2. Membranele intervin direct în metabolismul celulei. Procesele majore de conversiune a energiei se petrec în membrane: *fotosinteza*, în membrana internă a cloroplastelor, convertește energia solară în energie chimică, iar *fosforilarea oxidativă*, proces ce are loc în membrana internă a mitocondriilor, convertește în ATP energia rezultată din oxidarea alimentelor. Membranele reticulului endoplasmic și ale aparatului Golgi conțin enzime care participă la efectuarea unor reacții specifice, așa cum se va vedea la capitolele respective.

3. Membranele controlează fluxul de informații între celule și mediul înconjurător. Membranele conțin receptori specifici pentru stimuli primiți de la exterior sau de la alte celule: mișcarea bacteriilor spre hrană, răspunsul celulelor la legarea hormonilor și a medicamentelor de plasmalemă, percepția luminii sînt exemple de procese datorate recepționării informațiilor de la exterior. Membranele au și capacitatea de a emite informații, prin semnale chimice ori electrice, în comunicarea biologică (recunoașterea celulară, transmiterea influxului nervos).

4. Membranele pot suferi modificări funcționale adaptative, cum este proliferarea membranei reticulului endoplasmic neted sub acțiunea medicamentelor ce se metabolizează în aceste membrane.

5. Membranele au rol în procesele de apărare ale celulelor și ale organismului, în imunitate.

6.2. ORGANIZAREA MOLECULARĂ A MEMBRANELOR BIOLOGICE

6.2.1. COMPOZIȚIA MEMBRANELOR BIOLOGICE

Principalele componente ale membranelor biologice sînt proteinele și lipidele, deoarece resturile glucidice sînt întotdeauna atașate proteinelor sau lipidelor. Mai există și alte componente minore (ioni, apă) încă insuficient studiate cantitativ.

După compoziție se pot distinge trei tipuri de membrane (Tabel 6.1.). a) Mielina este prototipul de membrană cu rol de barieră și conține mai ales lipide și puține proteine. b) Membranele citoplasmice ale celulelor animale conțin circa 50% lipide și 50% proteine, fiindcă au și rol de barieră, dar îndeplinesc și funcțiile enzimatice. c) Membranele citoplasmice ale bacteriilor și membrana internă a mitocondriilor sau a cloroplastelor conțin o cantitate mare de proteine (75% din total), deoarece conțin multe sisteme enzimatice de membrană. Prin urmare, cu cît o membrană are o complexitate metabolică mai mare ea conține mai multe proteine și mai puține lipide.

Tabel 6.1. Compoziția chimică a membranelor celulare
(după Guidotti, 1972)

Membrana	Proteine (%)	Lipide (%)	Glucide (%)
Mielina	18	79	3
Membrane citoplasmatică:			
celule hepatice de șoarece	46	34	2-4
eritrocite umane	49	43	8
Membrana nucleară a celulelor hepatice de șobolan	59	35	2,9
Membrana externă a mitocondriei	52	48	2-4
Reticulul sarcoplasmic	67	33	
Membrana internă a cloroplastelor	70	30	6
Membrana internă a mitocondriei	76	24	1-2
Bacterii gram-pozitive	75	25	10
Membrana purpurie a bacteriei Halobacterium halobium	75	25	

Trecerea în revistă a tipurilor de lipide din membrane, ca și a proprietăților acestora, ca și o discutare a proprietăților proteinelor de membrană este de mare importanță pentru a înțelege relația structură-funcție la nivel molecular, adică tocmai obiectivul biologiei moleculare a membranelor.

6.2.1.1. Lipidele din membrane

Principalele clase de lipide întâlnite în membranele celulare sînt fosfolipidele, colesterolul și glicolipidele.

Fosfolipidele sînt de două categorii: fosfogliceride și sfingolipide. Fosfogliceridele se bazează pe molecule de glicerol, în care două grupări hidroxil sînt esterificate cu acizi grași, iar a treia poziție este ocupată de o grupare polară (fig. 6.1). De obicei în poziția mijlocie a lanțului de glicerol se află un acid nesaturat (cu una sau

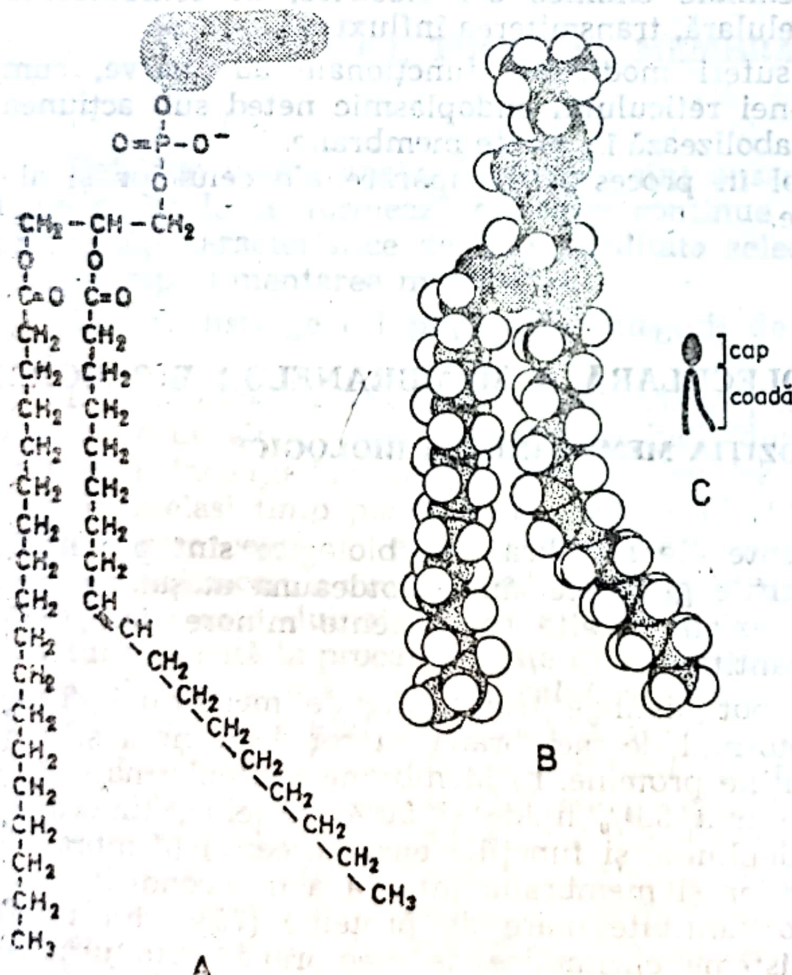


Fig. 6.1. A. Structura unei fosfolipide (fosfatidilcolina); B. Structura spațială; C. Reprezentare simplificată.

mai multe legături duble *cis*), iar la capătul opus grupării polare se află un acid saturat. Lungimea catenei acizilor grași variază între 12 și 24 atomi de carbon. Gruparea polară a fosfogliceridelor este variată, de un rest de acid fosforic fiind legate: colina (în lecitină sau fosfatidilcolină), etanolamina (în fosfatidiletanolamină), serina (în fosfatidilserină), inozitolul (în fosfatidilinozitol) (fig. 6.2.). Acestea sînt și principalele fosfogliceride.

Sfingolipidele au la bază *sfinhozina*, un aminoalcool cu lanț lung de atomi de carbon. În mare, structura sfingolipidelor este asemănătoare cu cea a fosfogliceridelor, avînd o grupare polară și două lanțuri hidrofobe de hidrocarbură; diferă însă de fosfogliceride prin faptul că un lanț lung este întotdeauna același (hidrocarbura cu 15 atomi de carbon din sfinhozină legată printr-o legătură simplă C—C de baza moleculei), în timp ce al doilea lanț lung, cel de acid gras, este legat printr-o legătură amidică (—CO—NH). În spațiu însă, sfingolipidele au structură asemănătoare fosfogliceridelor (fig. 6.2.). Cea mai răspîdită sfingolipidă este sfingomielina (ce are aceeași grupare polară ca și lecitina).

Glicolipidele din celulele animale au la bază tot structura sfingomielinei, dar în locul grupării polare fosforilcolină se află legate resturi glucidice. În cele mai simple glicolipide, numite cerebrozide, gruparea polară constă dintr-un singur asemenea rest, de exemplu glucoză sau galactoză. Galactocerebrozida este o componentă majoră a melinei și apare în proporție de 40% în monostratul extern din plasmalema celulei Schwann. În plasmalemele altor celule apar glicolipide neutre avînd pînă la 15 resturi glucidice, ce pot fi legate în lanțuri ramificate. Cele mai complexe glicolipide sînt *gangliozele*, ce conțin unul sau mai multe

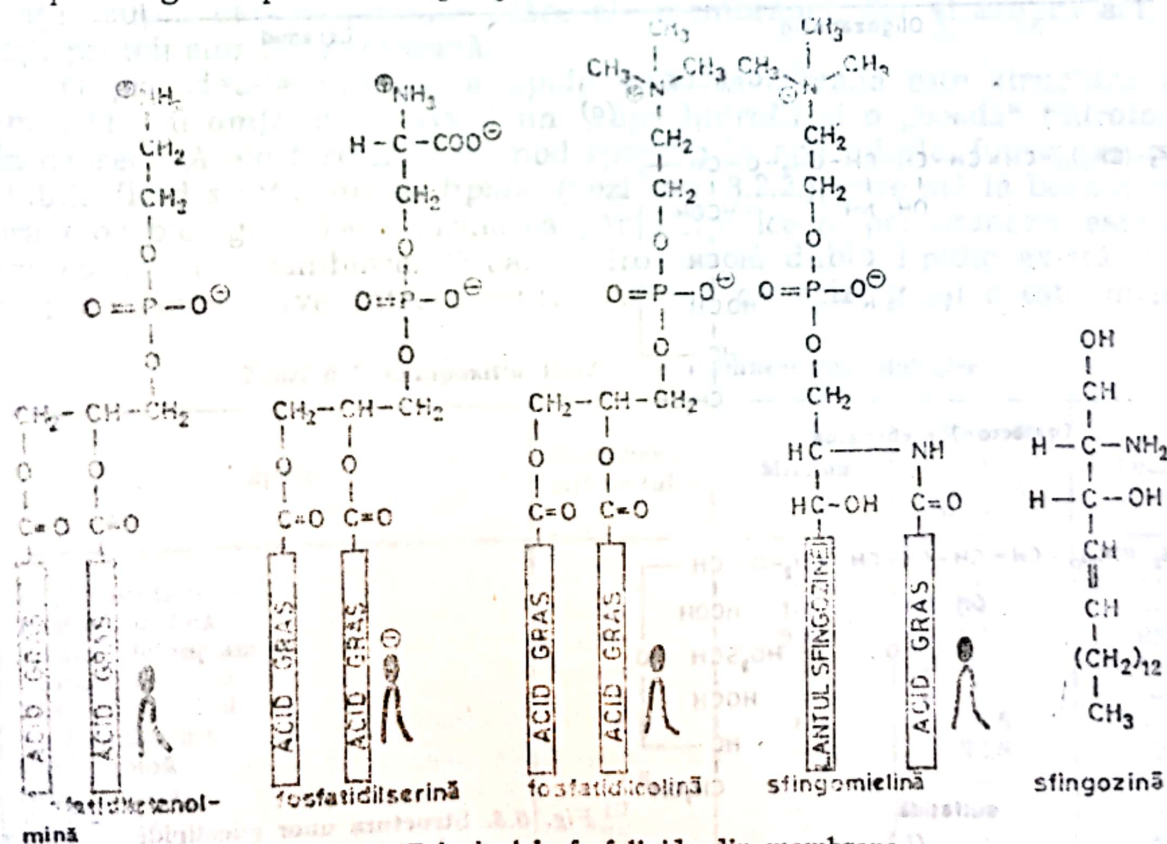


Fig. 6.2. Principalele fosfolipide din membrane.

resturi de acid sialic (numit și acid N-acetilneuraminic sau NANA), ceea ce le conferă sarcină electrică negativă (fig. 6.3). În plasmalema neuronului gangliozele reprezintă 60% din totalul lipidelor, dar apar în cantități mici în cele mai multe celule.

Colesterolul este o altă lipidă majoră din membranele celulelor eucariote (fig. 6.4). Proportia de colesterol este mai mare în plasmalemă și în mielină (deci în membranele la care predomină funcția de barieră) și mai mică în membranele intracelulare.

Compoziția lipidică a membranelor celulare variază de la un tip de membrană la altul chiar în aceeași celulă, de la o specie la alta, și de

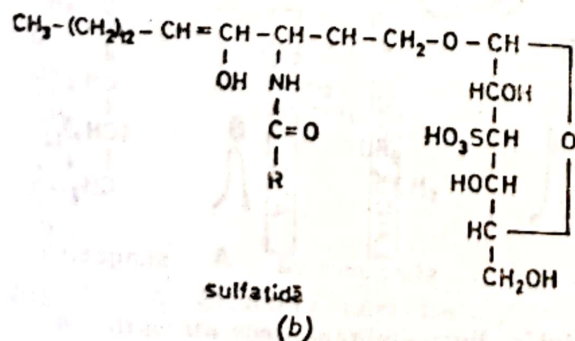
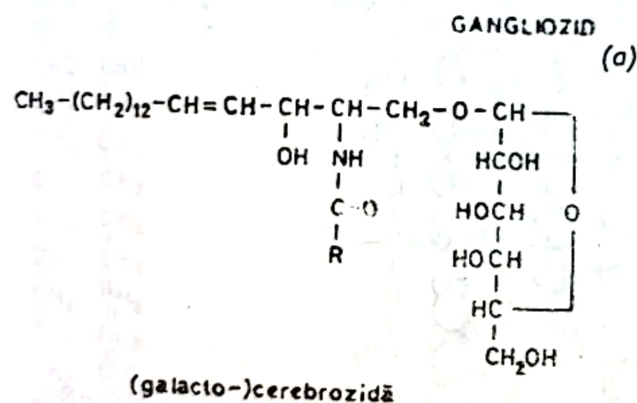
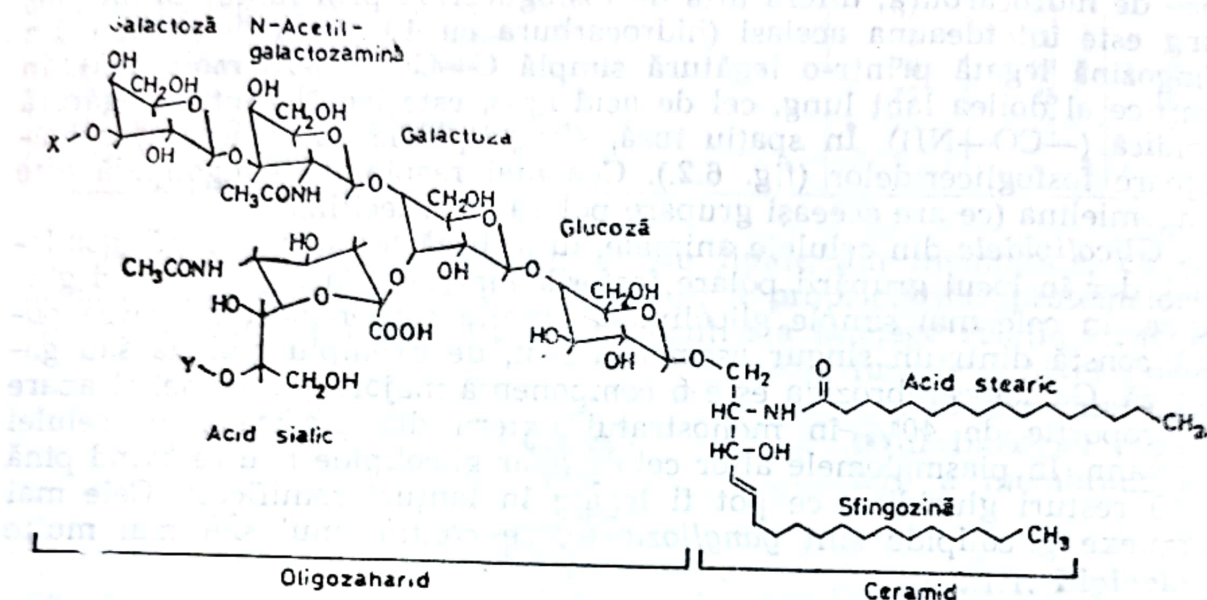


Fig. 6.3. Structura unor glicolipide: gangliozi de (a), cerebrozide (b).

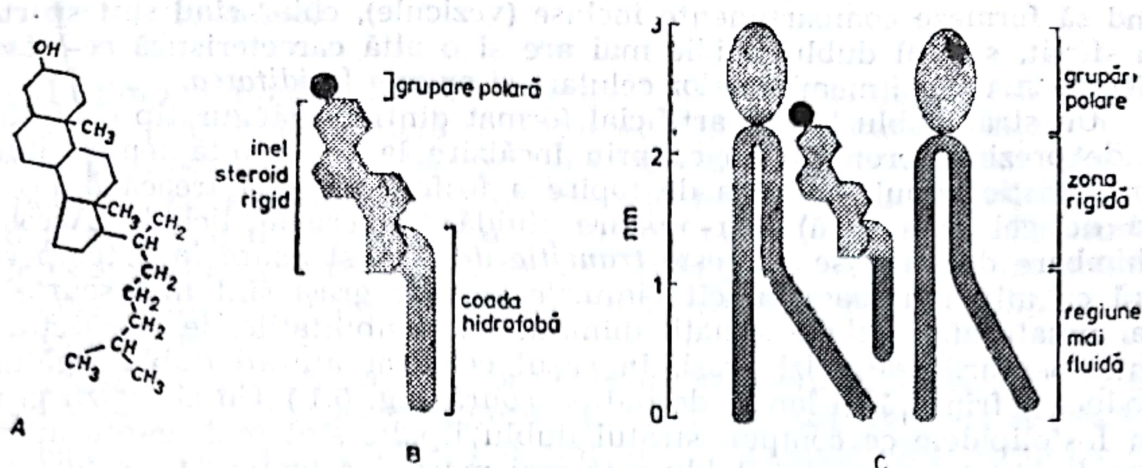


Fig. 6.4. Colesterolul. A : formula ; B : reprezentare simplificată ; C : intercalarea în stratul dublu lipidic.

la o celulă la alta, chiar cînd este vorba de același tip de membrană (Tabel nr. 6.2). În general există patru fosfolipide majore în toate membranele celulare: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina și sfingomielina; la ele se adaugă fosfatidilinozitolul ca fosfolipidă majoră în unele membrane, iar în membrana internă mitocondrială cardiolipina.

De asemenea variază foarte mult de la o membrană la alta (chiar la membrane de același tip, cum ar fi membranele mitocondriale la diferite specii) compoziția în acizi grași a fosfolipidelor, ceea ce are consecințe asupra caracteristicilor fizice ale membranei, dar și asupra activității proteinelor de membrană.

O proprietate comună a lipidelor de membrană este structura lor *amfifilă* sau *amfipatică*, avînd un „cap” hidrofîl și o „coadă” hidrofobă. În consecință ele formează în mod spontan în apă micle, forma cea mai stabilă fiind *stratul dublu lipidic* (vezi cap. 3.2.2.), care stă la baza membranelor biologice. Deci formarea părții lipidice a membranelor este un proces de autoasamblare. Deoarece în stratul dublu lipidic există interacțiuni cooperative între lanțurile vecine de acizi grași aceste micle

Tabel 6.2. Compoziția lipidică a membranelor biologice

Lipide	Membrana eritrocitului	Mielina	Mitocondrii din miocard bovin	E.coli
Acid fosfatidic	1,5	0,5	—	—
Fosfatidilcolină	19	10	39	—
Fosfatidiletanolamină	18	20	27	65
Fosfatidilglicerol	—	—	—	18
Fosfatidilinozitol	1	1	7	—
Fosfatidilserină	8,5	8,5	0,5	—
Cardiolipină	—	—	22,5	12
Sfingomielină	17,5	8,5	—	—
Glicolipide	10	26	—	—
Colesterol	25	26	3	—

tind să formeze compartimente închise (vezicule), chiar cînd sînt sparte. În sfîrșit, stratul dublu lipidic mai are și o altă caracteristică ce-l face adecvat structurii membranelor celulare și anume *fluiditatea*.

Un strat dublu lipidic artificial format dintr-un singur tip de fosfolipide prezintă proprietatea ca prin încălzire la o anumită temperatură caracteristică (mult sub cea de topire a fosfolipidei), să treacă din starea de gel (cristalină) într-o stare fluidă (de cristal lichid). Această schimbare de stare se numește *tranziție de fază* și apare la o temperatură cu atît mai joasă cu cît lanțurile acizilor grași sînt mai scurte și mai nesaturate; ambele situații diminuează posibilitățile de interacțiune dintre lanțurile de acizi grași, în cazul celor nesaturați dubla legătură produce o frîntură în lanțul de hidrocarbură (fig. 6.1.). Cu cît acizii grași din fosfolipidele ce compun stratul dublu lipidic sînt mai nesaturați cu atîta *fluiditatea* stratului dublu este mai mare, iar *temperatura de tranziție* are valori mai mici. Temperaturile de tranziție sînt caracteristice fiecărei membrane.

Fluiditatea este în chimia fizică inversul vîscozității și se aplică lichidelor izotrope (cu proprietăți identice în toate cele trei direcții ale spațiului). Membranele biologice sînt anizotrope, iar noțiunea de fluiditate a membranei se referă la mai mulți factori dintre care mobilitatea lipidelor joacă rol esențial. Se pot distinge mai multe tipuri de mișcări (fig. 6.5.): 1) *mișcări în interiorul moleculei fosfolipidelor*: a) mișcările de flexie ale atomilor de carbon din grupările metilenice ($-\text{CH}_2-$) din lanțurile acizilor grași (din ce în ce mai mobile spre centrul stratului dublu lipidic și mai rigide spre gruparea polară); b) mișcările atomilor din gruparea polară; 2) *mișcări ale întregii molecule de fosfolipide*: a) mișcarea de difuziune laterală (translație); b) mișcarea de rotație în jurul axei longitudinale a moleculei; c) mișcarea de difuziune transversală (flip-flop). Difuziunea laterală a fosfolipidelor se face foarte rapid, astfel că într-o secundă o moleculă străbate circa 2 μm (adică ajunge de la un capăt la altul al unei bacterii). Mișcarea de rotație se face și ea rapid, în schimb difuziunea transversală se face foarte încet (o moleculă la cîteva ore sau zile trece dintr-un monostrat lipidic în celălalt).

Colesterolul influențează puternic fluiditatea membranelor. Introdus în straturi duble lipidice artificiale cu lipide saturate, colesterolul crește fluiditatea membranei, pe cînd în cazul lipidelor nesaturate o scade. Intercalarea sa între fosfolipidele membranei produce rigidificarea lanțurilor de acizi grași spre gruparea polară, pe cînd fluiditatea spre interiorul membranei crește (fig. 6.4.).

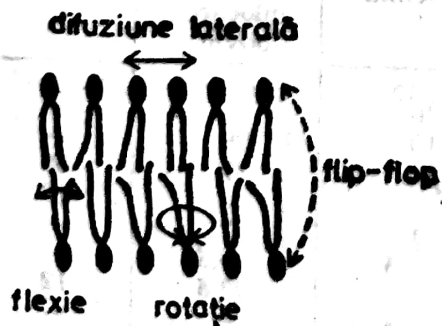


Fig. 6.5. Mișcările moleculelor de fosfolipide în stratul dublu lipidic.

Trebuie subliniat că lipidele din membranele tuturor celulelor se află la temperaturile fiziologice în starea de cristal lichid, deci în stare fluidă. Fluiditatea membranelor este o condiție esențială pentru desfășurarea tuturor funcțiilor membranelor biologice. Dacă *in vitro* se modifică temperatura de creștere a unor celule, atunci se modifică și compoziția în acizi grași a membranelor acestor celule, astfel încît să se mențină starea fluidă.

6.2.1.2. Proteinele

În timp ce lipidele asigură în primul rând funcția de barieră a membranelor, proteinele conferă funcționalitatea membranei: intervin în transportul activ, îndeplinesc funcții enzimatice sau de receptori. Așa se explică de ce procentul de proteine este mai mare în membranele ce îndeplinesc mai multe funcții decât în cele cu rol de barieră. Dimensiunile proteinelor sînt mai mari ca ale lipidelor, de aceea la un procent de 50% proteine în membrane corespund circa 50 molecule lipide la o moleculă de proteină.

Există două categorii de proteine de membrană. Unele pot fi extrase ușor, prin tratare cu soluții diluate de săruri. Acestea se numesc proteine periferice (*extrinseci*) și sînt atașate la exteriorul stratului dublu lipidic, interacționînd în principal prin forțe electrostatice cu grupările polare ale lipidelor, sau cu *proteinele integrale* (*intrinseci*). Această a doua categorie de proteine de membrană nu pot fi extrase decât după distrugerea structurii membranei prin detergenți. Aceștia sînt molecule mici amfifile ce formează micle în apă. Puși în contact cu membranele, detergenții dizlocuie lipidele ce sînt legate de proteinele integrale și le solubilizează. Dacă se îndepărtează apoi detergenții, proteinele integrale precipită, ceea ce face dificilă studierea structurii lor. De aceea una dintre principalele tehnici folosite pentru caracterizarea proteinelor de membrană este *electroforeza în gel de poliacrilamidă* în prezența detergentului dodecilsulfat de Na (SDS). Încălzind membranele la 100°C într-o soluție de SDS 1%, se desfac toate legăturile necovalente dintre proteine sau dintre ele și lipide, după care se supun electroforezei. SDS are sarcini negative, ceea ce neutralizează sarcinile pozitive ale proteinelor, deci migrarea în câmp electric devine funcție de greutatea moleculară a lor. Cu cît o proteină este mai mare, cu atîta migrează mai încet, fiind întîrziată de rețeaua gelului. Recent, separarea proteinelor de membrană a fost perfecționată prin introducerea de tehnici de separare bidimensională. În acest fel se pot identifica mult mai multe proteine decât prin tehnica monodimensională.

Unele membrane conțin doar 1—3 proteine majore. Rodopsina este singura proteină majoră în segmentul extern al bastonașelor din retină, mielina conține 3 proteine majore, reticulul sarcoplasmic are 2—3 proteine majore. În schimb, alte membrane, cum sînt cele mitocondriale, plasmalema, au zeci de proteine diferite. Peste 50 componente s-au identificat în plasmalemă.

S-au înregistrat în ultimii ani progrese însemnate în purificarea proteinelor de membrană, s-au descifrat secvențele unora dintre ele (rodopsinele) și s-a elucidat chiar structura tridimensională a unor proteine (bacteriorodopsina, citocromoxidaza, unii receptori etc.).

Localizarea specifică a unor enzime în membrane face ca enzimele respective să fie folosite ca „enzime marker”. Astfel sînt: 5'-nucleotidaza pentru plasmalemă, monoaminoxidaza pentru membrana externă a mitocondriei, citocromoxidaza și adenozintrifosfataza pentru membrana internă a mitocondriei, precum și glucozo-6-fosfataza pentru reticulul endoplasmic.

Aceste modele au fost elaborate pe baza unor tehnici fizico-chimice care au furnizat datele necesare: difracția razelor X, măsurătorile de tensiune interfacială, rezonanța magnetică nucleară, rezonanța electronică de spin, microscopia electronică.

În 1925 Gorter și Grendel extrag lipidele din membrana eritrocitelor și găsesc că la o comprimare maximă (măsurată cu dispozitivul Langmuir) ocupă o arie care este egală cu dublul ariei eritrocitelor. De aici s-a născut ideea existenței unui strat dublu lipidic ca bază a structurii membranelor biologice.

După 10 ani Danielli și Davson măsoară tensiunea superficială a membranei celulare găsind valori foarte joase, de circa 1 dyn/cm, în timp ce stratul dublu ar trebui să aibă circa 5 dyn/cm. Ei consideră că stratul dublu este tapetat de o parte și de alta de straturi de proteine, știut fiind că proteinele scad tensiunea interfacială. Astfel s-a născut primul model, Danielli—Davson, completat în 1960 de Robertson, care susținea că acesta este modelul „unitar” de structură a oricărei membrane biologice. După Robertson datele de microscopie electronică ar confirma ipoteza: zonele întunecate ar corespunde la 2 straturi proteice, iar zona clară dintre acestea stratului dublu lipidic (fig. 6.6.).

În modelul Danielli—Davson interacțiunile dintre proteine și lipide sînt de natură electrostatică, grupările polare ale acestora neutralizîndu-se reciproc, fiind ascunse contactului cu apa. Stratul dublu lipidic există într-adevăr în structura membranelor biologice. Totuși, modelul Danielli—Davson—Robertson este criticabil din mai multe puncte de vedere: — nu este probabil din punct de vedere termodinamic; se știe că orice sistem tinde să ia starea cu energie minimă, care este cea mai stabilă; în cazul de față capetele polare ale fosfolipidelor (lipidelor amfifile) trebuie să fie în contact cu mediul apos (extern sau intern), ele deci nu pot fi acoperite cu proteine;

— prin extragerea lipidelor din membrane structura membranelor ar trebuie să se destrame, ceea ce nu se întîmplă în realitate;

— aspectul tristratificat se observă și pe fotografiile fosfolipidelor examinate la microscopul electronic, iar pe de altă parte poate fi și un artefact ce apare în cursul fixării și colorării preparatelor;

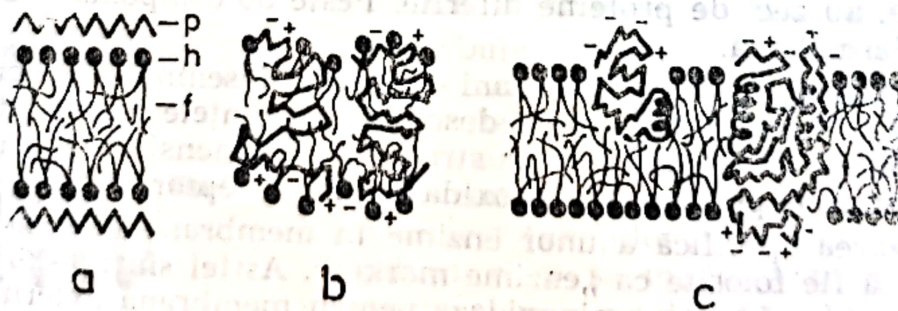


Fig. 6.6. Modele de organizare moleculară a membranelor.

a) modelul Danielli-Davson; b) modelul Benson; c) modelul în mozaic lipido-proteic.

— pentru a se realiza situația impusă de acest model proteinele din membrane ar trebuie să fie în cea mai mare parte în conformație de foaie pliantă antiparalelă (conformație beta); datele experimentale arată că proteinele din membrană sînt în conformație alfa și „random coil” (lanț răsucit la întîmplare), deci au formă mai mult sau mai puțin globulară. Totuși modelul Danielli—Davson corespunde în linii mari structurii mielinei.

Benson emite o altă ipoteză: proteinele din membrane sînt în mare parte globulare și încorporate în interiorul membranei. Moleculele lipide nu formează un strat dublu, ci lanțurile de acizi grași sînt intercalate între pliurile (buclele) lanțului polipeptidic, în așa fel încît capetele polare ale lipidelor să rămîină în exterior, expuse contactului cu apa. Rezultă complexe lipoproteice care sînt menținute alăturate prin interacțiuni hidrofobe (fig. 6.6.). Acest model este mai probabil din punct de vedere termodinamic decît modelul Danielli, dar intercalarea lanțurilor de acizi grași în lanțurile polipeptidice împiedică formarea legăturilor de hidrogen între peptide, ceea ce nu este favorabil din punct de vedere termodinamic. Se știe că în structura proteinelor stabilitatea lanțului este dată și de legăturile de hidrogen. Pe de altă parte, modelele bazate pe subunități nu sînt acceptabile fiindcă neagă existența unui strat dublu lipidic. Ori, existența lui în membrane a fost demonstrată convingător prin difracția razelor X.

Modelul cel mai acceptat la ora actuală este *modelul în mozaic lipido-proteic* (fig. 6.6.), elaborat de mai mulți autori, dintre care Singer l-a impus în literatură (Singer și Nicolson, 1972; Singer, 1971).

După acest model, proteinele integrale din membrană ar fi împlîntate în stratul dublu lipidic la fel ca niște „iceberguri” ce plutesc pe mare. Această „mare lipidică” este concepută fluidă, deci cu lipidele stratului dublu în stare de cristal lichid și în planul său proteinele se pot deplasa lateral (difuziune) sau se pot roti în jurul unei axe perpendiculare pe planul membranei. Se consideră azi că în marea lor majoritate proteinele integrale străbat stratul dublu lipidic de pe o față pe cealaltă (deci sînt *transmembranare*). Pentru a fi posibilă penetrarea proteinelor integrale în stratul dublu lipidic se sugerează că și proteinele membranei sînt amfipatice (ca și fosfolipidele), adică au o porțiune hidrofilă și o porțiune hidrofobă în moleculă. Partea hidrofilă ar proemina în afara membranei, fiind în contact cu mediul apos și cu grupările polare a fosfolipidelor; partea hidrofobă ar fi în interiorul membranei și ar interacționa cu lanțurile de acizi grași din molecula fosfolipidelor. În partea hidrofobă a proteinelor de membrană aranjarea aminoacizilor ar fi cu resturile hidrofobe la exterior, spre a putea interacționa cu acizii grași din fosfolipide. Părțile din moleculele proteinelor de membrană împlîntate în stratul dublu lipidic sînt compuse aproape exclusiv din aminoacizi hidrofobi. Modelul în mozaic lipido-proteic îndeplinește condițiile de stabilitate a structurii din punct de vedere termodinamic. În plus, există date experimentale de microscopie electronică și difracție a razelor X, ce susțin structura globulară a proteinelor de membrană și penetrarea lor în stratul dublu lipidic.

În tehnica de criofracturare („freeze-fracturing”) preparatul este înghețat, lovit cu un cuțit, astfel că se detașează o porțiune din mem-

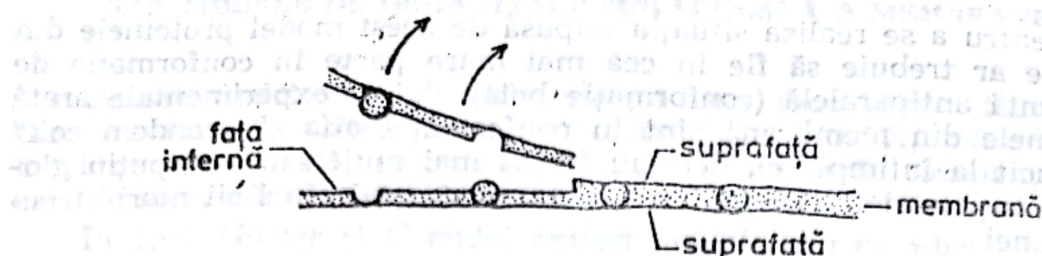


Fig. 6.7. Schema crio fracturării.

brană. Planul de fractură trece prin mijlocul membranei, paralel cu cele două fețe (fig. 6.7.). Se face apoi o replică a fracturii (din carbon și platină prin vaporizare), care se examinează apoi la microscopul electronic. Se observă proeminențe pe un fond neted. Proeminențele ar fi proteinele sau complexe de proteine din membrane, porțiunea netedă ar fi stratul dublu lipidic.

În sfârșit, prin microscopie electronică și difracția razelor X s-a determinat dispoziția spațială a componentelor în membrana purpurie a bacteriei *Halobacterium halobium* (fig. 6.8.). Proteina din această membrană, bacteriorodopsina, este formată din 7 segmente de alfa-helix care străbat stratul dublu lipidic al membranei, avînd orientare oblică, aproape perpendiculară pe suprafața membranei.

În concluzie, între datele ce apar aproape sigure în ceea ce privește organizarea moleculară a membranelor biologice menționăm întâi că stratul dublu lipidic este elementul structural de bază, modul fundamental de organizare a lipidelor în membranele biologice.

Este de asemenea bine stabilit că proteinele pot să fie atașate stratului dublu lipidic (proteinele periferice) sau să pătrundă în interiorul acestuia, traversînd membrana dintr-o parte în alta. Aranjarea lipidelor și proteinelor în membranele biologice trebuie să permită exercitarea maximă a forțelor de interacțiune dintre componente care să asigure stabilitatea membranei. Pentru fosfolipide grupările polare trebuie să aibă interacțiuni maxime cu moleculele de apă, în timp ce partea hidrofobă a moleculei trebuie să fie sechestrată în interiorul membranei. Pentru ca interacțiunile hidrofile și hidrofobe să fie maxime este necesar ca grupările hidrofile din proteine să fie în contact cu exteriorul, iar grupările hidrofobe să fie îngropate la interiorul membranei.

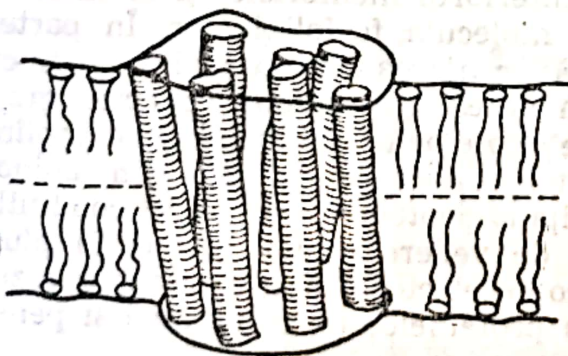


Fig. 6.8. Bacteriorodopsina în membrana purpurie a bacteriei *Halobacterium halobium*.

Ținînd cont de aceste considerații, putem conchide că modelul structurii în mozaic fluid lipido-proteic este un model de lucru acceptabil, cu precizarea importantă că reprezentarea lui pe desen redă doar o imagine instantanee, în realitate componentele membranei fiind în continuă mișcare. Comparatia stratului dublu lipidic al membranei cu o mare în care plutesc icebergurile reprezentate de proteinele mem-

branei ne dă o idee aproximativă despre structura membranei. Aceasta trebuie completată cu imaginea mobilității lipidelor (vezi cap. 6.2.1.1.) și a proteinelor.

Proteinele execută mișcări de translație (difuziune laterală) și de rotație. Mișcarea de translație a fost evidențiată prin microscopie de fluorescență pe culturi de celule de șoarece și om fuzionate sub acțiunea virusului Sendai. Se pot marca proteinele din membranele celor două tipuri de celule cu anticorpi fluorescenți colorați diferit. Urmărind fuziunea celor două celule se observă că la început se păstrează polaritatea fluorescenței, dar după circa o oră (la 37°C) cele două tipuri de proteine difuzează în membrană (fig. 6.9.). S-a demonstrat prin asemenea tehnici de fluorescență că proteinele membranei difuzează într-un minut pe distanță de câțiva μm .

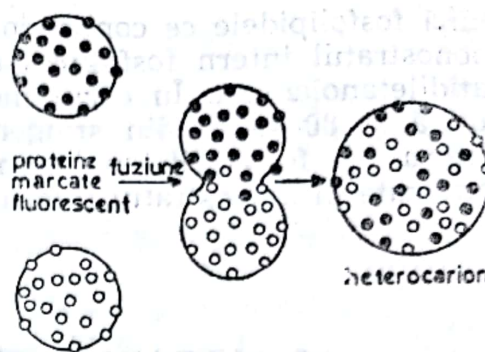


Fig. 6.9. Evidențierea difuziunii proteinelor în membrane.

Există și mișcări de rotație a proteinelor în membrane, în jurul unei axe perpendiculare pe planul membranei. Al doilea tip de rotație nu a fost evidențiat experimental. S-a putut demonstra însă că proteinele din membrane se rotesc în jurul unei axe perpendiculare pe planul membranei.

În ultimii ani s-a demonstrat că există o *asimetrie* a membranelor biologice, ce afectează localizarea tuturor componentelor membranelor biologice. S-a demonstrat prin studii cu enzime și anticorpi îndreptați împotriva suprafeței externe a celulelor și a virusurilor că *grupările glucidice* sînt localizate întotdeauna pe fața externă a membranei citoplasmice. Aceasta implică automat aranjarea asimetrică a *glicolipidelor* și *glicoproteinelor*. Ulterior s-a stabilit că și lipidele și proteinele ce nu conțin grupări glucidice sînt aranjate asimetric în membrane.

Glicolipidele se găsesc dispuse în plasmalema întotdeauna în jumătatea externă a membranei, deci grupările glucidice proemină pe suprafața celulei. Poziția lor strategică sugerează rolul glicolipidelor în comunicarea intercelulară și în legarea specifică a unor substanțe străine (rol de receptori).

În membranele intracelulare grupările glucidice se află localizate pe fața membranei ce mărginește lumenul compartimentului delimitat de membrană. În esență deci, în toate cazurile grupările glucidice se află dispuse pe partea membranei opusă citoplasmei.

Asimetria proteinelor prezintă și alte aspecte pe lângă cele privind localizarea la exterior a grupărilor glucidice. Partea proteinei aflată în stratul dublu lipidic este de obicei mult mai mică față de partea ce proemină în afara lui. Aceasta deoarece grosimea stratului dublu lipidic este de 4—5 nm, pe cînd unele proteine de membrană sînt mult mai mari. Părțile din moleculă situate în afara stratului dublu lipidic permit stabilirea interacțiunilor cu mediul extern sau cu citoplasma.

Asimetria lipidelor în membrane este demonstrată prin studii de marcarea cu reactivi specifici pentru anumite grupări chimice și prin studii cu fosfolipaze. În stratul dublu lipidic în monostratul extern predomina

mină fosfolipidele ce conțin colină (fosfatidilcolină, sfingomielină), iar în monostratul intern fosfolipidele cu grupe amino: fosfatidilserină și fosfatidiletanolamină. În cazul membranei eritrocitare 70% din fosfatidilcolină și 80—85% din sfingomielină se află localizate în monostratul extern, iar fosfatidiletanolamina și fosfatidilserina se află în majoritate localizate în monostratul intern.

6.3. SUPRAFAȚA CELULARĂ ȘI GLICOCALIXUL

Noțiunea de *suprafață celulară* cuprinde trei elemente: a. zona periferică a citoplasmei, de 1—2 μm grosime, numită *corticala celulară*, care de fapt este o parte a ectoplasmei; b. membrana plasmatică (*plasmalema*); c. *glicocalixul* (glicolema sau „îmbrăcăminte” celulei — „cell coat”).

Există și prelungiri sau *expansiuni citoplasmice la suprafața celulei*, care pot avea caracter temporar sau permanent. Dintre cele cu caracter temporar menționăm: undulațiile de suprafață (denivelări fine ale suprafeței celulare vizibile la microscopul electronic), pseudopodele și lamelipodele implicate în mișcarea ameboidală, bulele (ce apar și dispar rapid, ca și cum suprafața ar fi în fierbere) etc. Prolungirile cu caracter permanent sînt: microvilii, cillii și flagelii.

Celulele aflate în contact unele cu altele în țesuturi sînt separate unele de altele printr-un spațiu de 20—30 nm cuprins între cele două plasmaleme ale celulelor adiacente. *Spațiul intercelular* este format din cele două *glicocalixuri* ale celulelor vecine. Glicocalixul este un înveliș glucidic pe suprafața celulei, format din grupările glucidice ale glicoproteinelor și glicolipidelor din plasmalemă, dar și din glicoproteine și proteoglicani secretați de celule și adsorbiți apoi pe suprafața celulei (fig. 6.10). Deci în glicocalix există grupări glucidice ce aparțin unor componente ale plasmalemei, precum și alte componente ce sînt adsorbite pe plasmalemă (fiind comune cu cele din matricea extracelulară). Grosi-

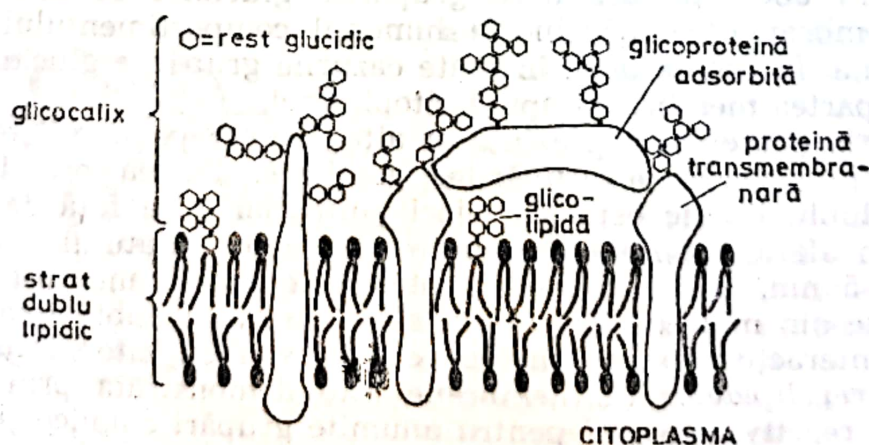


Fig. 6.10. Glicocalixul.

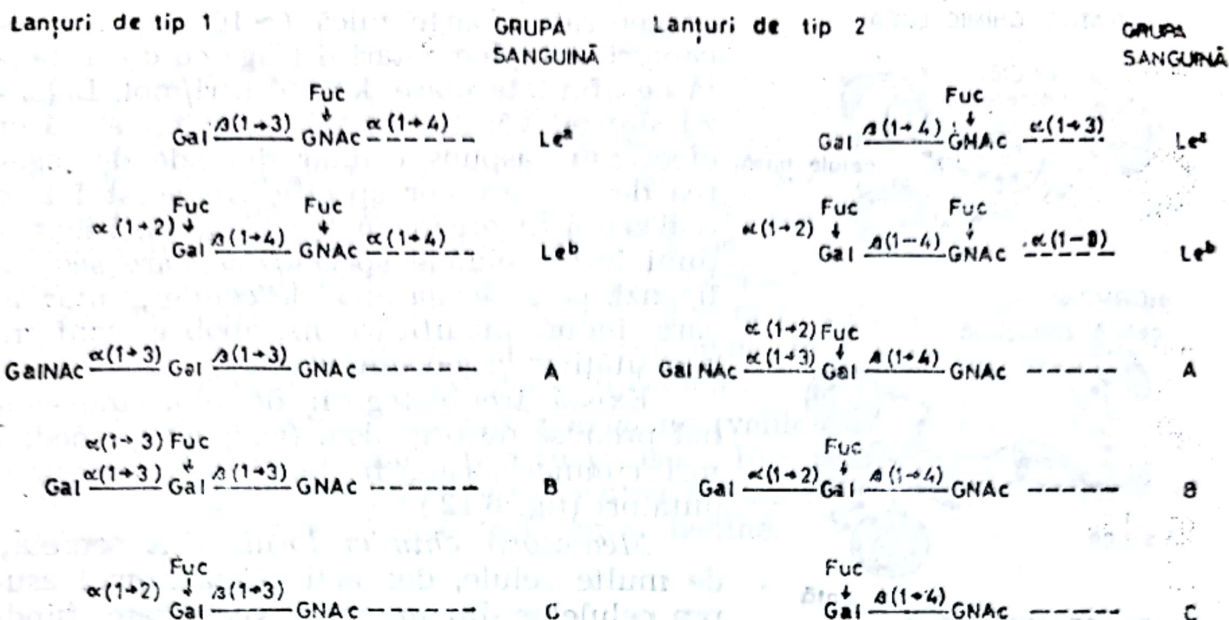


Fig. 6.11. Structura grupărilor glucidice din membrana eritrocitelor ce determină grupele sanguine.

mea glicocalixului este mai mare (circa 50 nm) pe suprafața celulei neangajate în interacțiuni cu celule vecine (de pildă polul apical din celulele mucoasei intestinale sau suprafața celulelor din sânge).

Dintre cele 100 monozaharide ce apar în natură, în glicoproteinele și glicolipidele membranelor se găsesc numai 9, principalele sînt: galactoză, manoză, fucoză, galactozamina, glucozamina, glucoza și acidul sialic. Resturile de acid sialic se află la capătul lanțurilor oligozaharidice și ele dau sarcina negativă a suprafeței celulelor eucariote.

Glicocalixul îndeplinește funcții esențiale: a) joacă un rol important în adeziunea sau adezivitatea intercelulară; b) asigură identitatea, individualitatea celulei, deoarece glicoproteinele sînt specifice nu numai speciei, ci și tipului de celulă; de pildă grupele sanguine umane, A, B, O etc. sînt determinate de grupările glucidice terminale aflate pe glicoproteine și glicolipide în membrana eritrocitelor (fig. 6.11.); c) glicocalixul conține grupările glucidice ale receptorilor aflați în plasmalemă; d) s-a mai propus rolul de depozit de cationi al glicocalixului. Avînd sarcini electrice negative, glicocalixul poate depozita cationi (de exemplu Ca^{2+}) ce pot intra la nevoie în celulă.

6.4. RECEPTORII DIN MEMBRANE

6.4.1. GENERALITĂȚI, RECEPTORII ȘI SEMNALIZAREA CHIMICĂ ÎNTRE CELULE

Receptorii sînt proteine avînd funcția de legare specifică și cu afinitate mare a unor substanțe extracelulare numite *liganzi*, prin legarea cărora se induc răspunsuri celulare caracteristice. Liganzii acționează în

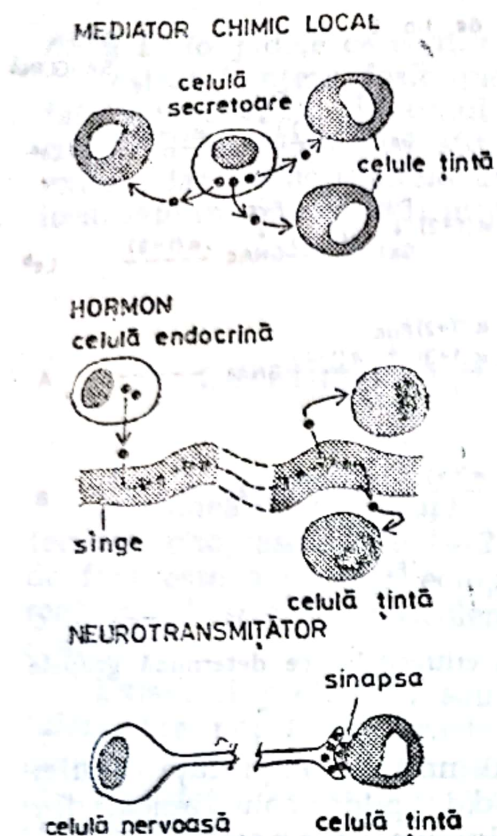


Fig. 6.12. Molecule-semnal endogene ce acționează pe receptori.

Celulele endocrine și neuronii sînt celule înalt specializate în semnalizarea chimică, iar hormonii și neurotransmițătorii sînt mesagerii de ordinul I ai acestor celule. Pe cale nervoasă și endocrină se realizează reglarea funcțiilor tuturor celulelor din organism.

concentrație foarte mică ($\sim 10^{-8}\text{M}$), iar receptorii complementari îi leagă cu o constantă de afinitate mare, $k \sim 10^8$ litri/mol. Liganzii sînt adevărate semnale chimice, al căror efect sau răspuns celular depinde de legarea de un receptor specific. În acest fel se realizează în organism foarte multe interacțiuni între celulele specializate care secretă liganzi, ce se leagă apoi de celule „țintă” în care induce modificări metabolice conform necesităților organismului.

Există trei categorii de molecule-semnal produse de organism (endogene): mediatori chimici locali, hormoni și neurotransmițătorii (fig. 6.12.).

Mediatorii chimici locali sînt secretați de multe celule, dar acționează numai asupra celulelor din imediata vecinătate, fiindcă sînt rapid captați sau distruși: *Hormonii* sînt secretați de celulele glandelor endocrine și pe cale sanguină ajung la celulele țintă aflate la distanțe mari în diferite zone din organism. *Neurotransmițătorii* sînt produși în diferite zone din organism. Neurotransmițătorii sînt produși de neuroni și sînt eliberați la nivelul sinapselor chimice, acționînd numai asupra celulei țintă adiacente.

6.4.2. TIPURI DE RECEPTORI

Se pot distinge două categorii mari de receptori după originea ligandului pe care îl leagă: receptori pentru substanțele endogene și receptori pentru substanțele exogene.

Receptorii pentru substanțele endogene sînt de mai multe feluri:

a) *Receptorii pentru neurotransmițătorii*: sînt situați în membrana postsinaptică a celulelor nervoase, musculare sau alte celule efectoare. În această categorie sînt cuprinși receptorii pentru acetilcolină, noradrenalină, dopamină, serotonină, adrenalină, histamină, acid gamma-aminobutiric, acid glutamic, glicină, acid aspartic, peptide mici (encefalină). Unele dintre aceste molecule nu acționează strict numai asupra unei celule postsinaptice, ci pot difuza local influențînd mai multe celule (deci au efecte de mediatori chimici locali).

b) *Receptorii pentru hormoni* sînt localizați diferit în celulă după cum hormonul este hidrofil (hidrosolubil) sau hidrofob. Dacă hormonul

este hidrofob (cum este cazul hormonilor steroizi și tiroidieni), el pătrunde ușor prin plasmalema celulei țintă și se leagă de receptori intracelulari. Dimpotrivă, hormonii hidrofili se leagă de receptori din plasmalemă și acești receptori transmit celulei informația necesară spre a-și modifica metabolismul. În această categorie intră receptorii pentru insulină, glucagon, adrenalina, hormoni ai hipofizei, parathormon. Cel mai bine cunoscut este receptorul insulinei. (Efectele hormonilor liposolubili vor fi amintite la cap. „Reglarea biosintezei proteinelor“.)

c) *Receptori implicați în reacțiile imunitare*: receptori pentru antigene endogene (foarte numeroși în plasmalema unor limfocite), receptori pentru anticorpi, receptori pentru complement.

Receptorii pentru substanțele exogene (vehiculate de obicei pe cale umorală includ: a) receptori pentru virusuri; b) receptori pentru antigene străine de organism; c) receptori pentru toxine bacteriene; d) receptori pentru medicamente; e) receptori pentru lectine.

6.4.3. EFECTELE CELULARE ALE LEGĂRII LIGANZILOR DE RECEPTORI

Legarea ligandului de receptor se face prin forțe slabe (hidrofobe, legături de hidrogen), într-o zonă specifică din molecula receptorului. Ca o consecință a legării de receptori din plasmalemă pot apare diferite modificări ale plasmalemei, prin care se induc apoi efecte intracelulare. Se pot da câteva exemple de modificări ale plasmalemei.

a) *Redistribuirea receptorilor* cu agregarea lor în anumite zone ale plasmalemei urmată de captarea la interiorul celulei prin vezicule (endocitoză). Exemplul cel mai caracteristic se întâlnește la limfocite tratate cu anticorpi bivalenți (ce au două locuri de legare) îndreptați împotriva unor proteine de membrană. Dacă anticorpii sînt marcați fluorescent se observă aglomerarea fluorescenței în anumite zone ale plasmalemei, zone care se adună apoi într-o cupolă sau beretă (engl. „cap“) la un pol al celulei. După aceea urmează captarea la interiorul celulei a zonei fluorescente prin formarea de vezicule (endocitoză). Această experiență demonstrează și fluiditatea membranei și posibilitatea proteinelor de membrană de a se deplasa în planul membranei.

Aglomerarea receptorilor se produce și în cazul endocitozei dependentă de receptori (vezi cap. 6.5.5.).

b) *Modificări de permeabilitate a plasmalemei* se produc la legarea neurotransmițătorilor de membrana postsinaptică și au rol în transmiterea și generarea impulsului nervos.

c) *Activarea unor enzime din plasmalemă* este concretizată în activarea adenilat ciclazei de către hormonii polipeptidici hidrosolubili. Legarea fiecărui hormon din această categorie se face de un receptor specific, dar ulterior complexul hormon-receptor declanșează un mecanism comun pentru toți hormonii hidrosolubili. Complexul hormon-receptor interacționează cu *proteina G* din membrană. Această proteină poate lega fie GTP, fie GDP. Dacă este legat GDP-ul adenilat ciclaza este inactivă; în schimb proteina G cu GTP activează adenilat ciclaza. Complexul hor-

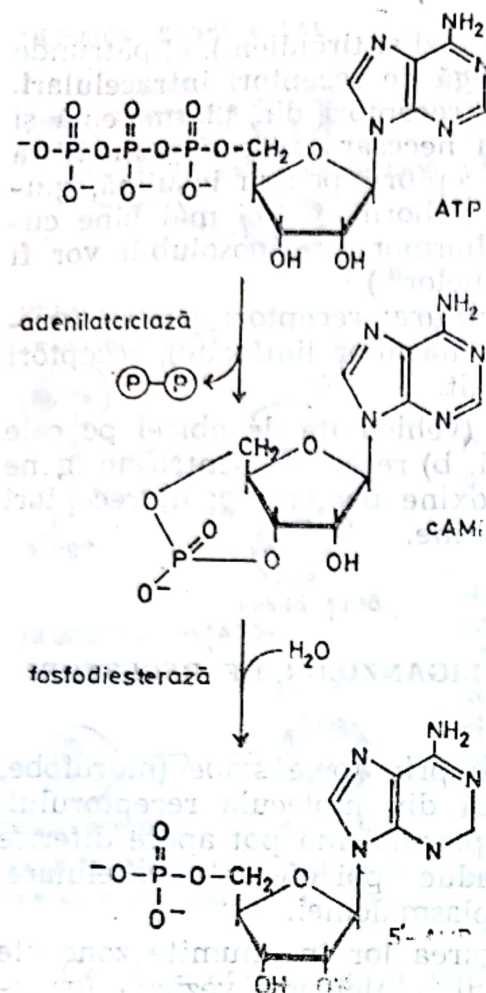


Fig. 6.13. Schema formării și inactivării cAMP.

mon-receptor catalizează schimbul GDP-ului cu GTP de pe proteina G. Aceasta produce acum activarea adenilat ciclazei, enzimă din plasmalemă ce catalizează formarea AMP-ului ciclic din ATP (fig. 6.13.). În citosol cAMP-ul activează foarte multe proteinkinaze (enzime ce fosforilează proteinele). La rândul lor proteinkinazele activează enzime variate, care în forma fosforilată devin active. Astfel se explică activarea sintezei glicogenului (prin stimularea glicogensintetazei), a glicogenolizei (prin activarea fosforilazei) etc. În celulele specializate cAMP-ul induce sinteza glucocorticoizilor în medulosuprarenală sub acțiunea ACTH, a progesteronului în corpul galben sub acțiunea hormonului luteal (LH), activarea transportului calciului în corticala rinichiului sub acțiunea parathormonului.

cAMP-ul este deci *mesagerul de ordinul II* al celulelor endocrine (hormonul fiind *mesagerul de ordinul I*). cAMP-ul este degradat de către o fosfodiesterază, care-l transformă în AMP.

Activarea adenilat ciclazei se produce și în condiții patologice. Astfel, toxina proteică a vibriunii holerice se leagă de un gangliozid (G_{M1}) din plasmalema celulei din mucoasa intestinală, prin aceasta se produce activarea ireversibilă a adenilat ciclazei (de pe care nu se mai poate

îndepărta GTP-ul). Rezultă în celulele mucoasei intestinale o cantitate foarte mare de cAMP, care activează transportul Na^+ prin mucoasă. Ionii de Na^+ atrag după ei transportul apei și așa se produce diareea severă din holeră.

d) *Creșterea concentrației intracelulare a Ca^{2+}* se poate produce prin deschiderea unor canale din plasmalemă, ce permit pătrunderea în celulă a Ca^{2+} extracelular sau prin eliberarea sa în citosol din compartimente intracelulare (de pildă în mușchi din reticulul sarcoplasmic).

Ca^{2+} se leagă în citosol de proteine specifice, dintre care cea mai importantă este *calmodulina*, identificată în toate celulele plantelor și animalelor. Calmodulina este deci o proteină ubicuitară, compusă dintr-un singur lanț polipeptidic de 148 aminoacizi; are patru locuri de legare a Ca^{2+} cu mare afinitate. Legarea Ca^{2+} produce o modificare conformațională a calmodulinei, astfel încât complexul Ca^{2+} -calmodulină se poate lega de foarte multe proteine și enzime din citosol, activându-le (fig. 6.14.). Printre acestea se numără: fosfodiesteraza cAMP și adenilat ciclaza, unele kinaze (enzime ce fosforilează alte proteine și enzime), Ca^{2+} -ATPaza din membrane. Unele molecule de calmodulină sînt aso-

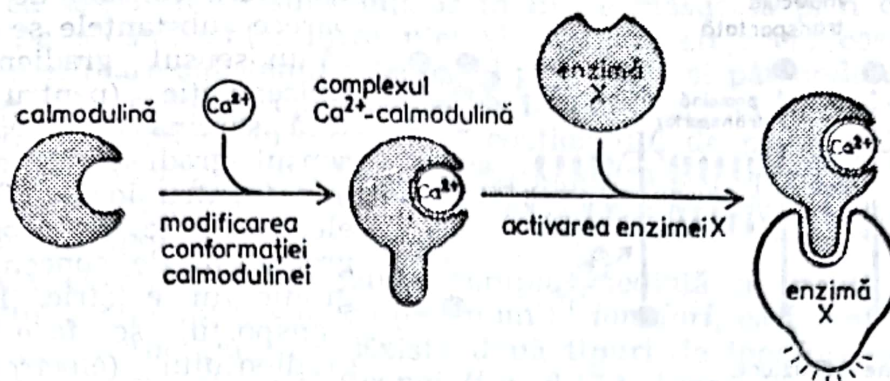


Fig. 6.14. Diagrama activării enzimelor prin calmodulină.

ciate cu fusul de diviziune sau componentele citoscheletului, ceea ce sugerează implicarea calmodulinei în reglarea proceselor dependente de aceste structuri (vezi și cap. 4.4.).

Activitățile celulare reglate de Ca^{2+} și cAMP se suprapun în mare măsură și chiar concentrațiile intracelulare ale celor două componente pot fi modificate de aceiași liganzi și se influențează reciproc. De aceea și Ca^{2+} este considerat ca un *mesager de ordinul II*.

Folosirea mesagerilor de ordinul II nu numai că traduce semnalele extracelulare (legarea ligandului de receptor) în semnale intracelulare, dar realizează și o amplificare foarte mare a semnalului inițial. Astfel, prin fiecare ligand ce se leagă de un receptor ce activează adenilat ciclaza de fapt se realizează activarea mai multor molecule de proteină G și deci a mai multor molecule de adenilat ciclază. La rândul ei această enzimă catalizează conversia unui mare număr de molecule de ATP în cAMP. La fel, în cazul când un ligand induce pătrunderea Ca^{2+} în celulă, de fapt pătrund mai mulți ioni de Ca^{2+} ; aceștia se leagă de mai multe molecule de calmodulină. La rândul lor, cAMP și complexul Ca^{2+} cu calmodulina activează multe proteine și enzime, deci se produc adevărate „avalanșe enzimatice” după legarea unei singure molecule de ligand. Datorită acestor mecanisme de amplificare, procentul receptorilor din plasmalemă nu depășește 1% din totalul proteinelor de membrană, dar eficiența lor în activarea proceselor celulare este extrem de mare.

6.5. TRANSPORTUL PRIN MEMBRANELE BIOLOGICE

6.5.1. TIPURI DE TRANSPORT

O proprietate esențială a membranelor celulare este cea de permeabilitate selectivă prin care se asigură efectuarea transportului de materiale prin plasmalemă sau prin celelalte membrane celulare. Se pot clasifica tipurile de transport după mai multe criterii:

Din punctul de vedere al consumului energetic (sub formă de ATP) se disting două tipuri: transportul activ și pasiv. *Transportul pasiv* se

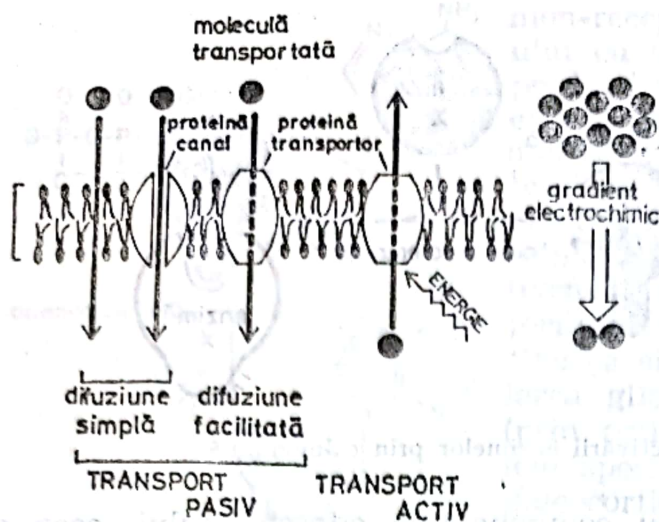


Fig. 6.15. Transportul activ și pasiv.

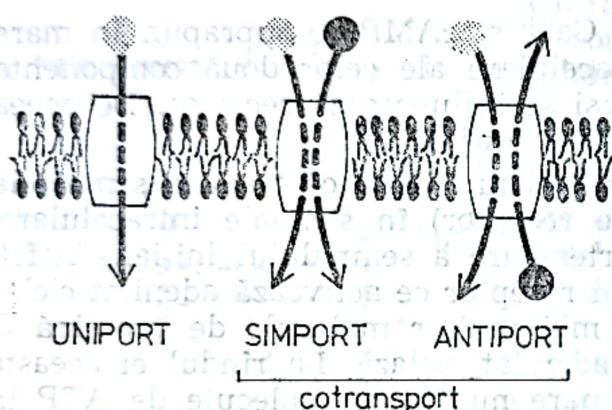


Fig. 6.16. Tipuri de transport după numărul speciilor transportate.

Acestea pot să transporte substanțele în mai multe feluri. Dacă o singură substanță este trecută dintr-o parte în alta a membranei, se vorbește de *sisteme uniport*. Dimpotrivă, *sistemele de cotransport* realizează transferul unei substanțe cuplat cu transferul altei substanțe în aceeași direcție (*simport*) sau în direcție opusă (*antiport*) (fig. 6.16).

6.5.2. TRANSPORTUL PASIV

Difuziunea simplă poate avea loc prin stratul dublu lipidic sau prin proteine. Fluxul substanțelor prin membrană este dat de *legea lui Fick* (vezi cap. 7.1. în ref. Benga, 1979).

A. Un exemplu de difuziune simplă prin stratul dublu lipidic este *pătrunderea substanțelor liposolubile conform coeficientului de partiție între ulei și apă*. Overton (cit. Loewy și Sicevitz, 1969) a observat încă din secolul trecut că pătrunderea substanțelor în celule a fost propor-

face fără consum de ATP deoarece substanțele se deplasează în sensul gradientului de concentrație (pentru molecule fără sarcină electrică) sau în sensul gradientului electrochimic (pentru ioni). Gradientul electrochimic este compus din gradientul de concentrație și gradientul electric. Dacă însă transportul se face împotriva gradientului (electro) chimic este necesar să se consume ATP și în acest caz se vorbește de *transport activ* (fig. 6.15.).

Pe de altă parte se poate diferenția transportul ionilor și moleculelor mici de transportul macromoleculelor și al particulelor. Ioni și moleculele mici trec prin stratul dublu lipidic sau prin proteinele membranei, deci „trec prin membrană” în adevăratul sens al cuvântului. În schimb macromoleculele și particulele „trec cu membrana”, deoarece sînt transportate prin vezicule ce se desprind din membrană.

În sfîrșit, se știe azi că majoritatea substanțelor sînt transportate prin *proteine de*

țională cu solubilitatea substanțelor în lipide măsurată prin *coeficientul de partiție* al substanței între ulei și apă. Cu cât acest coeficient are valoare mai mare substanța este mai liposolubilă și pătrunde mai repede în celule, deci există proporționalitate între constanta de permeabilitate (viteza de pătrundere în cm/sec.) și coeficientul de partiție. Există însă și excepții de la regula lui Overton: apa, ureea și metanolul. Regula lui Overton este importantă în explicarea trecerii prin membrane a unor medicamente lipofile.

B. Ca exemplu de difuziune simplă mediată de peptide amintim transportul ionilor prin substanțele numite *ionofori*, care sînt polipeptide produse de microorganisme. Există două tipuri de ionofori: *transportori mobili* sau *cărăuși* și de tip *canal* (fig. 6.17.). Ionoforii din prima categorie sînt peptide ciclice care au la interior un spațiu polar în care sechestrează în mod specific un anumit ion: de pildă *valinomicina* leagă K^+ . Exteriorul ionoforului este hidrofob. Ionoforii din această categorie preiau ionul pe o față a membranei, difuzează prin stratul dublu lipidic și eliberează ionul de cealaltă față, deci „fac naveta” prin membrană. Ionoforii de tip canal formează pori ce străbat stratul dublu lipidic, prototipul fiind *gramicidina*, un peptid linear compus din 15 aminoacizi cu resturi laterale hidrofobe. Două molecule de gramicidină vin în contact formînd un canal perpendicular pe planul membranei prin care cationii și apa difuzează mult mai rapid ca în cazul difuziunii prin stratul dublu lipidic.

Ionoforii produși de microorganisme sînt *antibiotice* (substanțe ce împiedică dezvoltarea altor microorganisme). Ele sînt arme de apărare ale unor microorganisme împotriva altora fiindcă anihilează potențialul de membrană. Ionofori de tip canal sînt și *filipina*, *nistatina* și *amfotericina B*, care formează pori numai în membranele ce conțin steroli, cum sînt membranele fungilor. De aceea sînt utilizate în practica medicală drept antifungice (antimicotice).

Ionoforii sînt folosiți ca instrumente de investigare a multor procese în biologia celulară și moleculară. Printre altele *ionoforul A 23187*, un transportor mobil al cationilor bivalenți, introduce Ca^{2+} și Mg^{2+} în celule transportînd apoi în afară doi H^+ . A 23187 nu influențează poten-

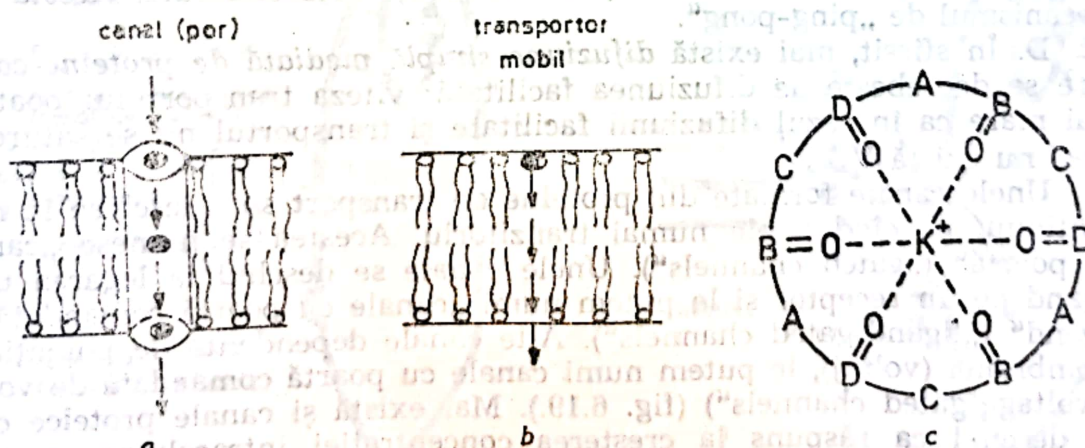


Fig. 6.17. Transportori de tip canal (a) și cărăuș (b) exemplificați prin complexul valinomicinei cu K^+ (c).

țialul de membrană, ci crește concentrația intracelulară a Ca^{2+} , de aceea este folosit pentru studierea efectelor Ca^{2+} .

C. *Difuziunea facilitată* se produce tot de la o concentrație mai mare la una mai mică (deci se oprește în momentul egalării concentrațiilor de cele două părți ale membranei), dar substanțele transportate trec mult mai rapid (de 100.000 ori) decât ar fi de așteptat pentru dimensiunea și solubilitatea lor în lipide. Substanțele sînt transportate de către proteine specifice, care se comportă ca niște enzime legate de membrană, fiindcă difuziunea facilitată are caracteristici comune cu cataliza enzimatică.

Fiecare proteină transportoare are un loc specific de legare a substratului (substanța transportată). Viteza transportului atinge valoarea maximă ($V_{\max}$), caracteristică pentru fiecare transportor, atunci cînd acesta este saturat (adică atunci cînd toate locurile de legare sînt ocupate). Apoi, fiecare transportor are o constantă caracteristică de legare a substanței ce o transportă, numită K_M , egală cu concentrația substanței cînd viteza de transport atinge jumătate din valoarea maximă. Aceste caracteristici definesc o cinetică de tipul Michaelis—Menten. Difuziunea facilitată mai are și alte caracteristici asemănătoare catalizei enzimatice: dependența de pH, inhibiția competitivă prin compuși similari cu substratul, inhibiția necompetitivă prin alte substanțe (ioni de metale grele) prezente în urme.

Ca exemple de difuziune facilitată se pot cita: transportul anionilor, al ureei, al glicerolului și al altor neelectroliti prin membrana eritrocitului, precum și transportul glucozei și al aminoacizilor prin plasmalema mai multor celule.

Deși nu se cunosc detaliile moleculare prin care funcționează proteinele transportor în difuziunea facilitată, este aproape sigur că procesul se deosebește clar de mecanismul cărăușului sau porului realizat de ioni. Se acceptă ideea că transportorul este o proteină transmembranară, care suferă modificări conformaționale reversibile (fig. 6.18.). Într-o anumită stare conformațională („pong”) locurile de legare pentru substanța ce trebuie transportată sînt expuse la exteriorul stratului dublu lipidic. În cealaltă stare conformațională („ping”) aceleași locuri sînt expuse spre partea opusă a membranei, iar substanța este eliberată. Acesta este mecanismul de „ping-pong”.

D. În sfîrșit, mai există *difuziune simplă mediată de proteine-canal*, care se deosebește de difuziunea facilitată: viteza transportului poate fi mai mare ca în cazul difuziunii facilitate și transportul nu se saturează (deci nu există $V_{\max}$).

Unele canale formate din proteine de transport sînt deschise în mod continuu, pe cînd altele numai tranzitoriu. Acestea se numesc „canale de poartă” („gated channels”). Unele canale se deschid la legarea unui ligand pe un receptor și le putem numi „canale cu poartă comandată de ligand” („ligand-gated channels”). Alte canale dependente de potențialul membranei (voltaj), le putem numi canale cu poartă comandată de voltaj („voltage-gated channels”) (fig. 6.19.). Mai există și canale proteice care se deschid ca răspuns la creșterea concentrației intracelulare a unor ioni: de exemplu canalele pentru K^+ ce se deschid atunci cînd crește concentrația Ca^{2+} în citosol.

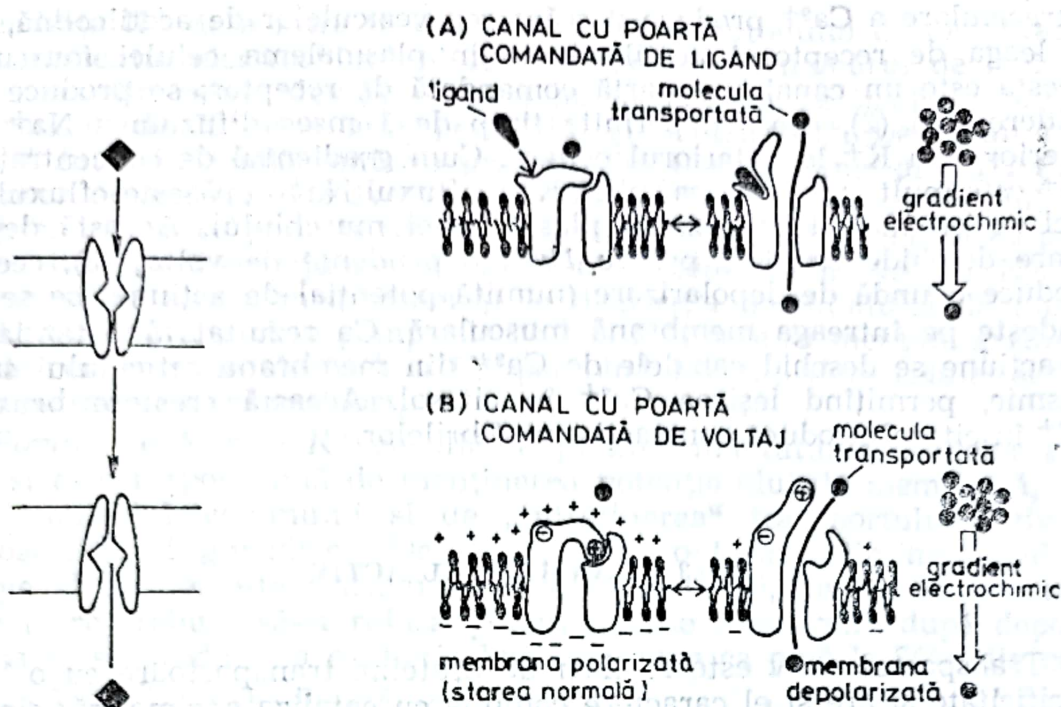


Fig. 6.18. Diagrama modificărilor conformaționale ale proteinelor de transport.

Fig. 6.19. Diagrama canalelor proteice cu poartă.

Exemple de canale cu poartă există în funcționarea *joncțiunii neuromusculare*, în care un impuls nervos produce contracția mușchiului. Cel puțin patru canale se deschid în mai puțin de o secundă (fig. 6.20.).

Descreșterea potențialului plasmalemei (depolarizarea) terminației neuronului deschide canalul pentru Ca^{2+} (1). Creșterea concentrației

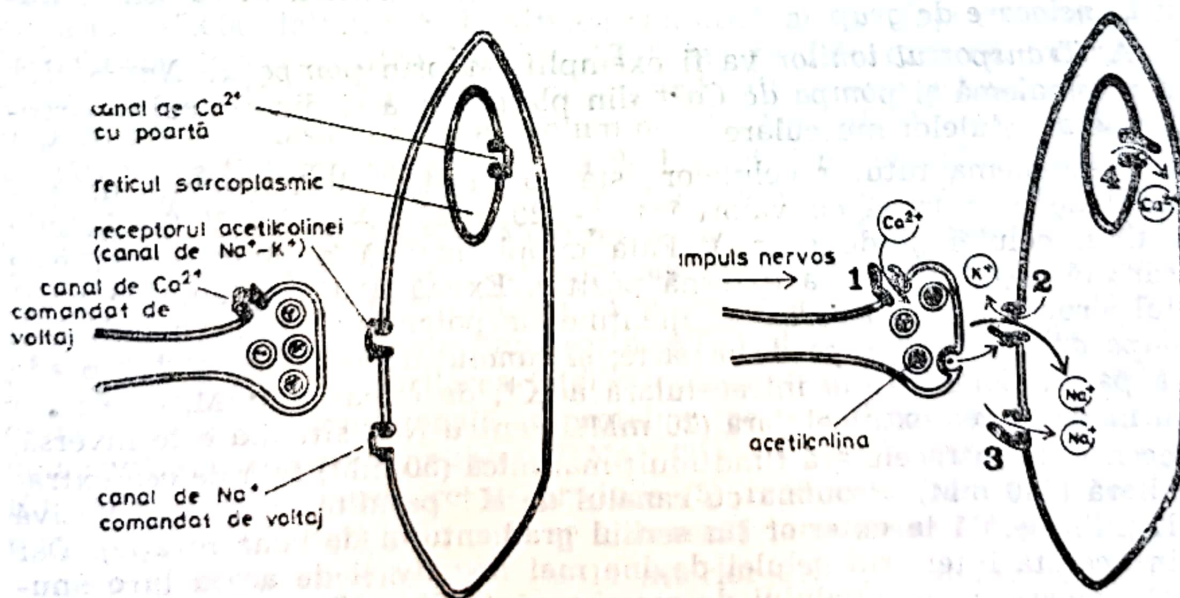


Fig. 6.20. Diagrama funcționării canalelor ionice din joncțiunea neuromusculară.

intracelulare a Ca^{2+} produce descărcarea veziculelor de acetilcolină, care se leagă de receptorul acetilcolinei din plasmalema celulei musculare. Acesta este un canal cu poartă comandată de receptor; se produce deschiderea lui (2), ceea ce permite timp de 1 msec difuziunea Na^+ spre interior și a K^+ la exteriorul celulei. Cum gradientul de concentrație al Na^+ este mult mai mare ca cel al K^+ , influxul Na^+ depășește efluxul K^+ , deci se produce depolarizarea plasmalemei mușchiului. Această depolarizare deschide canalele pentru Na^+ , dependente de voltaj (3), ceea ce produce o undă de depolarizare (numită potențial de acțiune) ce se răspândește pe întreaga membrană musculară. Ca rezultat al potențialului de acțiune se deschid canalele de Ca^{2+} din membrana reticulului sarcoplasmic, permițând ieșirea Ca^{2+} în citosol. Această creștere bruscă a Ca^{2+} în citosol produce contracția miofibrilelor.

6.5.3. TRANSPORTUL ACTIV

Transportul activ este realizat de proteine transportoare cu o înaltă specificitate și are și el caractere comune cu cataliza enzimatică: cinetica de tipul Michaelis—Menten etc. Ceea ce-l deosebește de difuziunea facilitată este consumul de energie. Există mai multe tipuri de transport activ după felul în care se utilizează energia. Astfel, *transportul ionilor* prin plasmalemă și alte membrane se realizează de către proteine ce folosesc direct energia din ATP, aceste pompe ionice având și proprietate ATPazică. Alteori, cum este cazul *transportului aminoacizilor și glucidelor* prin plasmalemă, se folosește energia gradientelor ionice (realizate prin ATP), deoarece transportul acestor substanțe se face cuplat cu transportul Na^+ (cotransport). În cazul *bacteriorodopsinei* se folosește energia luminii pentru pomparea H^+ . În sfârșit, la unele bacterii se folosește fosfoenolpiruvatul ca sursă de energie pentru mecanismul numit *translocare de grup*.

A. *Transportul ionilor* va fi exemplificat prin *pompa de Na^+ și K^+* din plasmalemă și *pompa de Ca^{2+}* din plasmalemă și din reticulul sarcoplasmic al celulelor musculare.

Plasmalema tuturor celulelor este polarizată, adică prezintă un potențial de membrană cu valori între -20 mV și -200 mV (în funcție de tipul celulei și de specie). Fața citoplasmatică a plasmalemei este încărcată negativ iar cea externă pozitiv. Există două proteine ce joacă rolul crucial în generarea și menținerea potențialului de membrană: *pompa de Na^+ și K^+* pe de o parte, și *canalul de pierdere al K^+* pe de altă parte. Concentrația intracelulară a K^+ , de circa 400 mM, este mult mai mare ca cea extracelulară (20 mM). Pentru Na^+ situația este inversă, concentrația intracelulară fiind mult mai mică (50 mM) față de cea extracelulară (440 mM). Proteina cu canalul de K^+ permite difuziunea pasivă a K^+ din celulă la exterior (în sensul gradientului de concentrație). Dar prin aceasta interiorul celulei devine mai negativ și de aceea la o anumită valoare a potențialului de membrană (-75 mV) tendința K^+ de a părăsi celula datorită gradientului de concentrație este contrabalansată

de tendința K^+ de a intra în celulă datorită potențialului de membrană. Deci gradientul electrochimic al K^+ se anulează și numărul de ioni de K^+ ce ies din celulă devine egal cu numărul celor ce intră în celulă. Dar canalul de K^+ este ușor permeabil și pentru Na^+ . Deci unii ioni de Na^+ intră în celulă conform gradientului electrochimic al Na^+ . Prin transport de sarcini pozitive la interiorul celulei scade potențialul de membrană, ceea ce permite ieșirea altor ioni de K^+ . Prin repetarea proceselor descrise s-ar ajunge la egalarea concentrațiilor Na^+ și K^+ de o parte și de alta a membranei și la dispariția potențialului de membrană, dacă nu ar exista pompa de Na^+ și K^+ , care să mențină gradientele de concentrație ale Na^+ și K^+ pompând Na^+ în afara celulei și K^+ în citoplasmă (sistem antiport).

Pompa de Na^+ și K^+ se află în plasmalema tuturor celulelor animale și este responsabilă de menținerea potențialului de membrană, dar și de controlul volumului și de „întreținerea” transportului activ al aminoacizilor și glucidelor. De aceea, peste o treime din necesarul de energie al celulei este consumat de această pompă, iar în celulele nervoase (care trebuie să-și refacă potențialul de membrană după depolarizarea ce se produce la excitația lor) se ajunge ca pînă la 70% din consumul energetic să revină pompei.

După 1957 s-a descoperit că pompa de Na^+ și K^+ este aceeași proteină cu $Na^+—K^+$ ATPaza, o enzimă ce scindează ATP-ul în ADP și fosfat anorganic (P_i) și care necesită Na^+ și K^+ pentru activitatea optimă, fiind inhibată specific de *glicozidele cardiotonice* (digitală și ouabaină). Transportul Na^+ și K^+ este deci cuplat cu hidroliza ATP. Pentru fiecare moleculă de ATP hidrolizată se pompează la exterior $3Na^+$ și la interior $2K^+$, fiecare moleculă de ATPază putînd scinda 100 molecule de ATP pe secundă.

$Na^+—K^+$ ATPaza a fost purificată și a putut fi reconstituită în lipozomi, unde a funcționat normal. Ca structură este compusă dintr-o subunitate mare catalitică (de 100.000 daltoni) și o glicoproteină asociată (de 45.000 daltoni). Subunitatea catalitică are pe fața citoplasmatică locurile de legare pentru Na^+ și ATP, iar pe fața externă locurile de legare pentru K^+ și ouabaină; această subunitate este asimetrică, avînd o porțiune citoplasmatică mai voluminoasă. Ansamblul celor două subunități poate fi comparat cu o crosă de hochei și un puc (Jamieson, 1985, comunicare personală). Deși există încă necunoscute privind mecanismul de funcționare al $Na^+—K^+$ ATPazei se acceptă că transportul are loc prin modificări conformaționale analoage mecanismului de „ping-pong” desoris la difuziunea facilitată, cu excepția că aci modificările sînt consecința unui ciclu de fosforilare (prin ATP) și defosforilare (fig. 6.21.). Legarea Na^+ (1) și fosforilarea feței citoplasmatică a proteinei (2) induce o modificare conformațională a proteinei ce „se deschide la exterior” (analogă stării „pong”), eliberînd Na^+ (3). Apoi de la exterior se leagă K^+ (4) și defosforilarea ce se produce (5) readuce proteina la conformația inițială („ping”) prin care se eliberează la exterior K^+ (6). *int*

Pompînd la exterior $3Na^+$ și la interior $2K^+$, proteina contribuie și direct la generarea potențialului electric de membrană (fiindcă se pompează în exces sarcini pozitive). Această contribuție reprezintă nu-

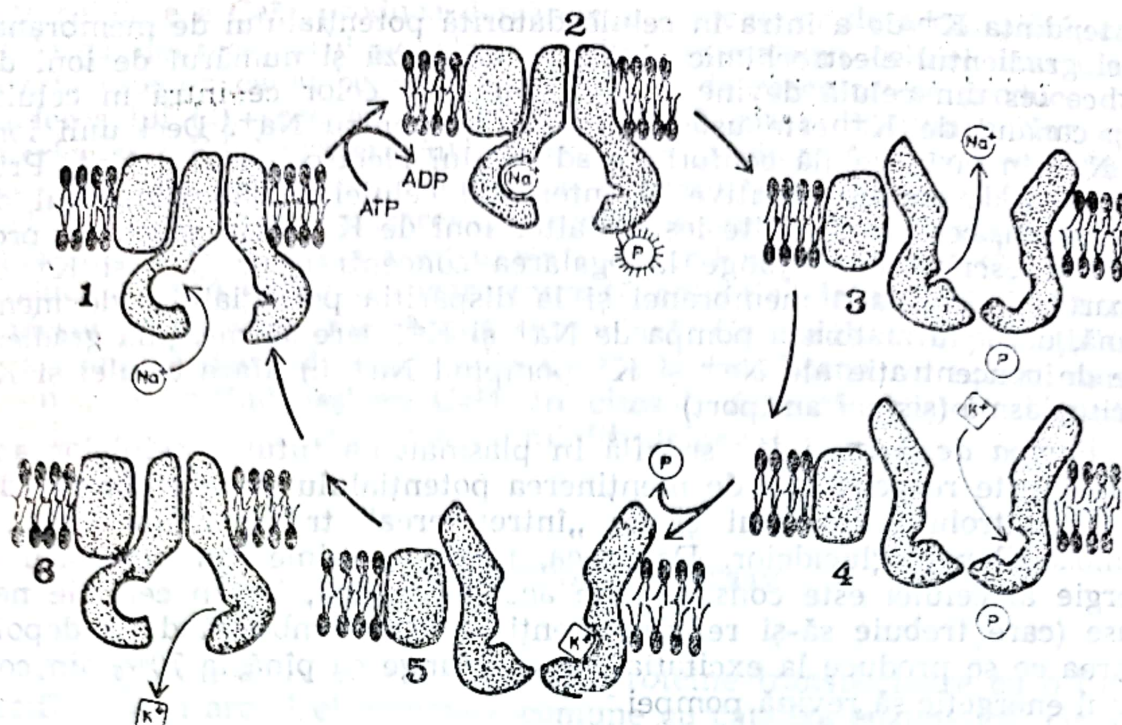


Fig. 6.21. Diagrama modificărilor conformației $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPazei.

mai 20%, fiindcă majoritatea potențialului de membrană (80%) se datorează gradientelor de Na^+ și K^+ menținute prin $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPază, combinate cu permeabilitatea mai mare a plasmalemei pentru K^+ decât pentru Na^+ sau anioni.

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaza mai contribuie și la reglarea volumului celular. Presiunea osmotică a citoplasmei este determinată în principal de proteine și de K^+ . Volumul celular este determinat de echilibrul dintre presiunea osmotică și cea a mediului extracelular (lichidului interstițial, plasmiei etc.). În lichidul interstițial presiunea osmotică este determinată în primul rând de Na^+ și Cl^- (acesta este în concentrație de circa 540 mM față de 100 mM în citosol). Dar Na^+ și Cl^- tind să intre în celulă datorită gradientelor lor de concentrație, ceea ce ar crește presiunea osmotică intracelulară și deci celula s-ar umfla. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaza, pompând la exterior Na^+ și menținând interiorul celulei negativ (ceea ce contracarează gradientul de concentrație al Cl^-), împiedică creșterea volumului celulei.

Pompele de Ca^{2+} sînt importante în menținerea concentrației scăzute de Ca^{2+} în citosol (10^{-7}M) față de o concentrație mult mai mare a Ca^{2+} extracelular (10^{-3}M). Există în plasmalemă o pompă de Ca^{2+} numită și Ca^{2+} ATPază ce transportă activ Ca^{2+} la exterior.

Gradientul enorm de concentrație al Ca^{2+} asigură condiții pentru transmiterea de semnale de la exterior la interiorul celulei prin plasmalemă. Reglarea concentrației Ca^{2+} în citosol este importantă și pentru procesele de secreție celulară și motilitate.

De asemenea există o Ca^{2+} ATPază în membrana reticulului sarcoplasmic din mușchi, ce pompează Ca^{2+} din citosol. Această enzimă este destul de bine caracterizată: constă dintr-un singur polipeptid format

din circa 1000 resturi de aminoacizi, pompează 2Ca^{2+} pentru fiecare moleculă de ATP hidrolizată și poate hidroliza până la 10 molecule de ATP pe secundă. Când impulsul nervos depolarizează plasmalema celulei musculare, Ca^{2+} este eliberat din reticulul sarcoplasmic în citosol, stimulând contracția mușchiului.

Bacteria *Halobacterium halobium* are într-o zonă specializată a membranei sale, numită *membrana purpurie*, proteina *bacteriorodopsina* ce funcționează la lumină ca o pompă de protoni, expulzând protonii la exterior, creînd astfel potențialul de membrană.

O caracteristică generală a pompelor ionice este *reversibilitatea* lor. Așa cum s-a descris, prin hidroliza ATP-ului ele mențin gradientele ionice; dimpotrivă, puse în condiții în care se induc gradientele de concentrație ionică extrem de mari (ce depășesc capacitatea pompelor), în loc să consume ATP pentru a crește gradientele de concentrație ionice pompele sînt reversate: ionii se scurg conform gradientelor de concentrație, iar enzima sintetizează ATP din ADP și fosfat anorganic. Asemenea reversări s-au obținut în laborator cu $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaza din membrana eritrocitară, dar există și enzime care în condiții fiziologice sintetizează ATP ca o consecință a gradientelor de H^+ generate prin transportul electronilor (în membrana bacteriilor și în mitocondrii) sau prin fotosinteză (în membrana cloroplastelor). În acest caz ATPazele respective se mai numesc și *ATPsintetaze*.

B. *Transportul activ cuplat cu gradientele ionice* este reprezentat de transportul glucozei și al aminoacizilor prin plasmalema.

Transportul glucozei prin plasmalema celulelor din mucoasa intestinală și a celulelor din tubii renali prezintă importanță foarte mare. Astfel, deși filtratul glomerular al rinichiului conține glucoză în concentrație aproximativ egală cu cea din plasmă, în urină nu apare în mod normal glucoză fiindcă ea este reabsorbită în tubii renali printr-un proces de transport activ. Absorbția intestinală a glucozei ar fi foarte ineficientă dacă s-ar face prin transport pasiv, fiindcă ar însemna că în intestin concentrația glucozei să fie în permanență mai mare ca în plasmă. În realitate, în ambele cazuri glucoza este transportată împotriva gradientului de concentrație de către un căraș al glucozei de care se leagă și Na^+ . Este un sistem simport: Na^+ tinde să intre în celulă conform gradientului său electrochimic și într-un sens antrenează glucoza. Cu cît gradientul de Na^+ este mai mare și viteza transportului este mai mare; dacă se reduce mult gradientul de Na^+ se oprește transportul glucozei. Na^+ care intră cu glucoza este pompat în afară de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaza ce menține gradientul Na^+ (fig. 6.22.).

Transportul aminoacizilor se face tot prin sisteme simport cu Na^+ , existînd cel puțin cinci proteine diferite în plasmalema celulelor animale (une pentru fiecare grup de aminoacizi înrudit structural).

În membrana bacteriilor cele mai multe sisteme de transport folosesc drept ion cotransportat H^+ în loc de Na^+ . Astfel, transportul unor glucide și aminoacizi în bacterii se face cuplat cu transportul H^+ . Cel mai studiat exemplu este *transportorul lactozei* (permeaza sau proteina M), de 30.000 daltoni, ce funcționează în simport cu H^+ : un proton este transferat pentru fiecare moleculă de lactoză transportată în celulă.

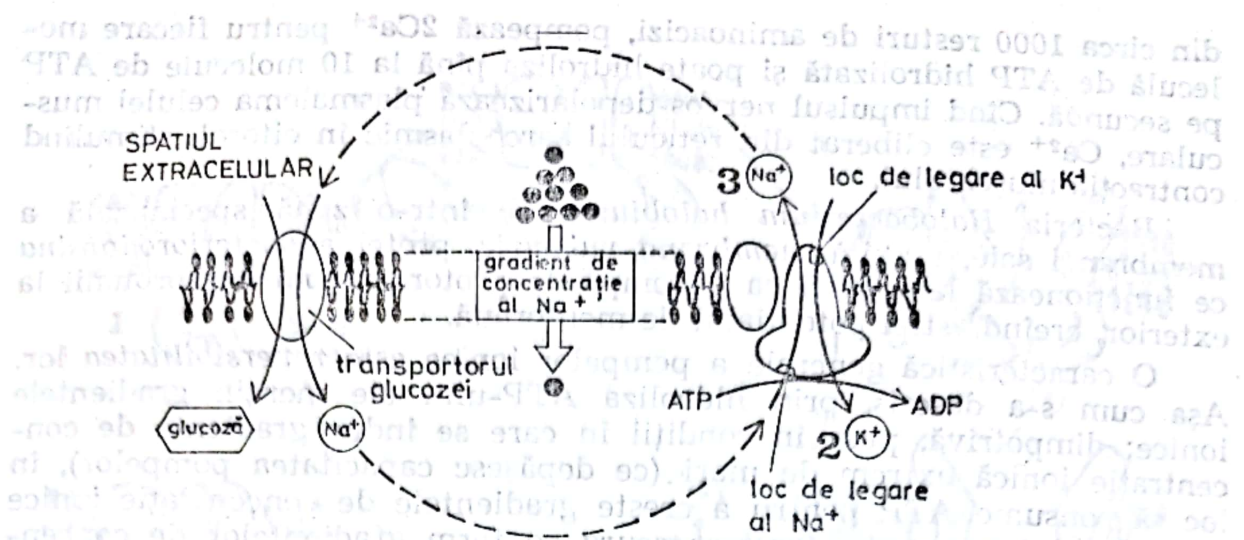


Fig. 6.22. Diagrama transportului glucozei cuplat cu transportul Na^+ .

C. *Translocarea de grup* se întâlnește la unele bacterii și constă în fosforilarea unor glucide în cursul trecerii lor prin plasmalemă. Sistemul de fosforilare (fosfoenolpiruvat transferaza) este complex, implicând patru proteine și fosfoenolpiruvatul ca sursă de energie (fig. 6.23.).

Prin fosforilare glucidele devin ionizate și nu mai pot părăsi celula. Mai mult, fosforilarea glucidelor captate menține o concentrație mică de glucide libere în celulă, deci gradientul de concentrație duce la continuă captare a glucidelor.

D. Tot la bacterii se mai întâlnesc sisteme pentru transportul activ al glucidelor și aminoacizilor ce implică proteine hidrosolubile localizate în spațiul dintre plasmalemă și peretele celular (spațiul periplasmic). Proteinele au locuri de legare specifice pentru substanțele pe care le transportă, de aceea se numesc *proteine de legare periplasmice*. Deși au fost purificate, li s-a determinat structura primară și la unele chiar și cea tridimensională, încă nu este clar cum funcționează. Se pare că fiecare proteină de legare periplasmică preia câte o substanță pe care apoi o cedează unei proteine de transport transmembranară. Aceleași proteine de legare periplasmice funcționează și ca receptori în *chemotaxis* (mișcarea bacteriei în sensul creșterii concentrației unei anumite substanțe nutritive).

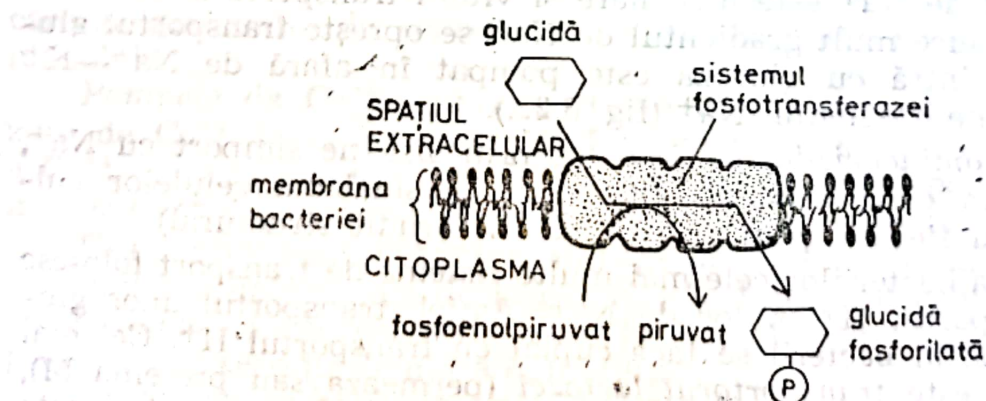


Fig. 6.23. Diagrama translocării de grup prin sistemul fosfotransferazei din membrana bacteriilor.

6.5.4. TRANSPORTUL DIRECT AL UNOR MACROMOLECULE PRIN MEMBRANE

Există cazuri speciale când macromoleculele (ADN sau proteine) pot străbate direct membranele celulare fără a se forma vezicule. Asemenea situații se întâlnesc la bacterii în cursul procesului de *transformare genetică*, în care molecule de ADN trec atât prin peretele celular cât și prin plasmalema. În celulele eucariote proteinele de secreție trec direct prin membrana reticulului endoplasmic rugos pe măsură ce sînt sintetizate (vezi cap. „Reticulul endoplasmic”). În sfîrșit, unele toxine bacteriene trec prin plasmalema celulelor animale și își exercită efectele în citosol. În cele mai multe cazuri macromoleculele sînt trecute prin membrane prin vezicule.

6.5.5. TRANSPORTUL PRIN VEZICULE: ENDOCITOZA, EXOCITOZA ȘI TRANSCITOZA

Un mod special de transport prin membranele biologice îl reprezintă transportul prin vezicule (sau în masă). Se pot distinge trei procese: exocitoza, endocitoza și transcitoza (fig. 6.24.), după cum transportul are loc spre interiorul celulei, din citoplasmă la exterior sau, respectiv, prin vezicule ce străbat complet celula dintr-o parte în cealaltă.

Exocitoza se produce prin fuziunea unor vezicule din citoplasmă cu plasmalema și astfel materialele din vezicule sînt vărsate în afara celulei. Asemenea procese apar la nivelul sinapselor, când veziculele conținînd mediatori chimici (acetilcolină, noradrenalină etc.) fuzionează cu membrana plasmatică a terminației neuronului (membrana presinaptică). Mediatorii chimici vărsați în spațiul sinaptic se leagă de receptori specifici din membrana postsinaptică producînd depolarizarea ei. În acest fel se asigură transmiterea influxului nervos la nivelul sinapselor.

De asemenea prin exocitoză se varsă la exterior produsele secretate de celulă (vezi cap. „Secreția celulară”).

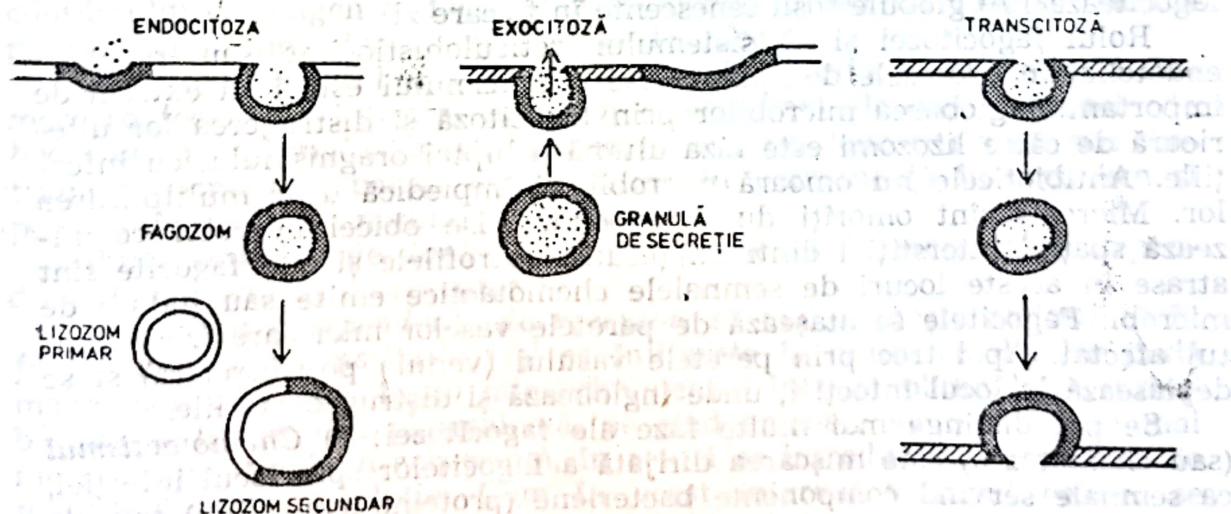


Fig. 6.24. Transportul pe calea veziculelor: endocitoza, exocitoza și transcitoza (transportul transcelular).

Endocitoza este de două feluri după natura substanțelor ce pătrund în celulă: *fagocitoza* și *pinocitoza*. Prin fagocitoză pătrund substanțe solide (gr. *fagein* = a mânca, deci „celula mănîncă”), pe cînd prin pinocitoză pătrund macromolecule în soluție (gr. *pinein* = a bea, deci „celula bea”). În ambele cazuri de endocitoză materialele pătrund în celulă înglobate în vezicule ce se desprind din plasmalemă și care ajunse în citoplasmă se numesc *endozomi* (fagozomi, respectiv pinozomi). Aceștia se unesc apoi cu un lizozom primar, se formează un lizozom secundar în care materialele încorporate sînt digerate, produșii de digestie trecînd în citoplasmă (vezi cap. „Lizozomi”). Trebuie menționat că particulele solide mari sînt ingerate (fagocitate) numai de către celulele specializate (fagocite). În schimb, majoritatea celulelor au capacitatea de a îngloba macromolecule în soluție. De aceea de cele mai multe ori termenii de pinocitoză și endocitoză sînt aplicați ca sinonime (Alberts și colab., 1983).

Fagocitoza este o modalitate de hrănire la protozoare. La mamifere și la om fagocitoza joacă un rol important în procesele de apărare ale organismului, pe această cale fiind înglobate și apoi distruse bacteriile, paraziții, substanțele străine, resturi celulare, celule degenerate, îmbătrînite și celule maligne. Celulele capabile de fagocitoză se numesc fagocite. La om și la mamifere acestea sînt de două tipuri: *macrofage* și *neutrofile*. Ambele rezultă din celule precursorare aflate în măduva osoasă, apoi circulă în sînge cîteva zile (unde macrofagele sînt reprezentate de monocite, iar leucocitele polimorfonucleare cu granulații neutrofile reprezintă circa 60% din globulele albe din sînge), după care trec din vase în țesuturi unde își exercită funcția fagocitară. Macrofagele sînt numite și histiocite. Fagocitele formează în organism un adevărat sistem fagocitar, aflat sub control nervos și umoral. Acest sistem are componente mobile (celulele circulante și în special neutrofilele) și componente sesile, reprezentate de macrofage. Acestea se află în splină, ganglioni limfatici, ficat (celulele Kupffer), vasele sanguine, alveolele pulmonare, pleură, peritoneu.

Funcția fagocitelor de îndepărtare a celulelor bătrîne este cantitativ mai importantă ca cea de distrugere a microbilor. Astfel, macrofagele fagocitează 10^{11} globule roșii senescente în fiecare zi.

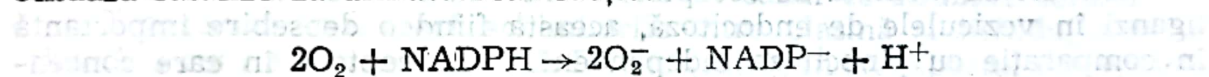
Rolul fagocitozei și al sistemului reticulohistiocitar sau reticulo-endotelial în procesele de apărare ale organismului este însă extrem de important. Înglobarea microbilor prin fagocitoză și distrugerea lor ulterioară de către lizozomi este faza ultimă a luptei organismului cu infecțiile. Antibioticele nu omorîă microbii, ci împiedică doar multiplicarea lor. Microbii sînt omorîți după fagocitare. De obicei microbii colonizează spațiul interstițial dintr-un țesut. Neutrofilele și alte fagocite sînt atrase în aceste locuri de semnalele chemotactice emise sau induse de microbi. Fagocitele se atașează de peretele vaselor mici care irigă țesutul afectat. Apoi trec prin peretele vasului (venula post-capilară) și se deplasează la locul infecției, unde înglobează și distrug bacteriile.

Se pot distinge mai multe faze ale fagocitozei: a) *Chemotactismul* (sau chemotaxia) este mișcarea dirijată a fagocitelor spre locul infecției, ca semnale servind componente bacteriene (proteine sau lipide) sau ale organismului: proteine serice cum este kallicreina, componentele siste-

mului numit complement (11 proteine serice care amplifică răspunsul imun), produse ale limfocitelor (limfokine), factori eliberați de neutrofile etc. b) *Recunoașterea și atașarea fagocitelor de particule* se face prin receptori din plasmalema fagocitului ce recunosc liganzi de pe suprafața particulei. În cazul fagocitării celulelor senescente sau maligne sînt recunoscute grupări glucidice din plasmalemă. De pildă, dacă acidul sialic este îndepărtat de pe membrana eritrocitelor, acestea sînt rapid fagocitate de splină. Celulele maligne au foarte puțin acid sialic pe suprafața lor și de aceea sînt distruse de către sistemul reticuloendotelial de cele mai multe ori înainte ca să se dezvolte o tumoră. În cazul bacteriilor de cele mai multe ori este necesară acoperirea lor cu anticorpi sau/și complement, pentru a putea fi fagocitate. Acest proces de modificare a suprafeței bacteriilor pentru fagocitoză se numește opsonizare (gr. *opsonein* = a pregăti pentru mîncare). c) *Înglobarea*: se face prin emiterea de către fagocit a unor prelungiri numite pseudopode, ce înconjoară particula și o închid apoi complet într-o veziculă internalizată în citoplasmă numită fagozom. Procesul de înglobare a fost comparat cu închiderea unui fermoar.

d) *Omorîrea celulelor fagocitate și digerarea lor*: se face după fuziunea fagozomului cu un lizozom primar și formarea fagolizozomului (numit și lizozom secundar).

În omorîrea bacteriilor au rol mai mulți factori; unii țin de lizozomi (vezi cap. „Lizozomii“). Un rol important revine însă unei oxidaze din plasmalemă, care ajunge în cursul fagocitozei în membrana fagozomului. Oxidaza catalizează următoarea reacție:



Anionul superoxid (O_2^-) este generat în interiorul fagolizozomului și, în mod spontan, este imediat convertit în apă oxigenată (H_2O_2). Apoi, din reacția O_2^- cu H_2O_2 rezultă radicalul liber hidroxil ($OH^\cdot$) și oxigenul singlet (1O_2), specii foarte reactive și toxice care omoară microbii. Datorită reacției catalizate de către oxidază se produce o creștere bruscă a consumului de oxigen al fagocitelor în momentul activării lor sub acțiunea factorilor chemotactici din focarul de infecție.

Lipsa oxidazei (o boală genetică) duce la apariția în organism a numeroase focare de infecție, cu puroi (granulome), de aici și numele de *boala cronică granulomatoasă*. La acești bolnavi leucocitele nu pot distruge nici microbii banali care pătrund în permanență în organism și pe care un organism normal îi distruge ușor.

Pinocitoza este de două feluri: independentă de receptori și dependentă (sau mediată) de receptori.

Pinocitoza independentă de receptori se mai numește *endocitoză în fază fluidă* (sau *constitutivă*) și se întâlnește la multe celule. De pildă macrofagul ingerează în 30 min echivalentul întregii plasmaleme, fibroblastele o treime din plasmalemă, pe cînd amebele au o viteză și mai mare a pinocitozei. În consecință, în celulă se introduc mari cantități de macromolecule în soluție. Cum în acest interval volumul celulei se menține constant, înseamnă că, simultan cu endocitoza, este adăugată o cantitate echivalentă de materiale plasmalemei. Deci din veziculele de

endocitoză o parte se reîntorc la plasmalemă, iar componentele plasmalemei sînt astfel recirculate sau reciclate. Reciclarea membranelor constă în fuziunea cu plasmalema a unor vezicule de endocitoză, a căror membrană nu a fost digerată în lizozomi.

Pinocitoza dependentă de receptori sau *endocitoza mediată de receptori* (sau *adsorbtivă*) se realizează cu ajutorul receptorilor din plasmalemă ce recunosc macromolecule specifice din lichidul extracelular. Legarea ligandului de receptor induce difuziunea complexului ligand-receptor în zone speciale din plasmalemă, care apar ca niște *depresiuni* îmbrăcate, tapetate, pe fața citoplasmatică de proteine speciale. Depresiunile (engl. „coated pits”), numite și *caveole*, devin apoi vezicule de endocitoză, care își mențin cîtva timp după internalizare îmbrăcămintea sau tapetul, sînt deci acoperite cu o rețea de proteine. Dintre proteine cea mai bine caracterizată este *clatrina*, cu greutatea moleculară de 180.000 daltoni și cu secvențe conservate în decursul evoluției. Trei molecule de clatrină împreună cu trei polipeptide mai mici se asociază într-o structură caracteristică, numită *triskelion* (Foto 20), cu trei brațe încîrligate. Din această unitate de bază se formează rețeaua de clatrină, ca o plasă care îmbracă depresiunile sau veziculele. Uneori rețeaua de clatrină îmbracă numai depresiunea, pentru ca în momentul cînd se formează vezicula aceasta să se strecoare printre ochiurile rețelei, devenind veziculă de endocitoză neîmbrăcată, numită *receptozom*; aceasta spre a o deosebi de *pinozom* (vezicula de la endocitoza independentă de receptori).

Endocitoza mediată de receptori realizează o concentrare a anumitor liganzi în veziculele de endocitoză, aceasta fiind o deosebire importantă în comparație cu pinocitoza independentă de receptori, în care concentrația substanțelor din vezicule este egală cu cea din fluidul extracelular.

Un proces important, ce se produce prin endocitoză mediată de receptori, este captarea colesterolului în celulele animale. Majoritatea colesterolului este transportat în sînge sub forma complexelor numite lipoproteine cu densitate mică („low-density lipoproteins”, LDL), care sînt particule sferice de circa 22 nm ce au la interior un miez compus din circa 1500 molecule de colesterol esterificat cu acizi grași, iar la exterior un strat dublu lipidic cu o proteină. Cînd o celulă animală necesită colesterol pentru sinteza membranelor sale, se produc receptori pentru LDL, aceștia sînt inserați în plasmalemă, după care complexe LDL-receptori se deplasează în depresiunile îmbrăcate în clatrină. Se produce endocitoza complexelor, veziculele își pierd rapid rețeaua de clatrină, fuzionează cu alte vezicule formînd endozomi. În aceștia, receptorii se aglomerează la un pol, după care această parte se desprinde din endozom formînd o veziculă cu receptori care se deplasează spre plasmalemă, cu care fuzionează. În acest fel se produce reciclarea receptorilor. Restul endozomului fuzionează cu un lizozom și esterii de colesterol sînt hidrolizați. Colesterolul liber trece în citosol unde inhibă sinteza receptorilor pentru LDL, dar și sinteza colesterolului.

La persoane cu o boală genetică în care se produc receptori pentru LDL anormali (receptori care nu pot lega LDL sau nu se pot deplasa în depresiuni), nu se pot capta LDL în celulă, în consecință celulele

sintetizează colesterol în cantități foarte mari. Se produce o hipercolesterolemie enormă, ceea ce duce la formarea prematură de plăci aterosclerotice în peretele vascular și prin aceasta bolnavii mor în copilărie sau foarte tineri prin complicațiile aterosclerozei (infarct miocardic în special).

O formă particulară a transportului prin vezicule o reprezintă transcitoza, ce realizează transportul macromoleculelor prin celulele endoteliului capilar. Trebuie subliniate contribuțiile românești în acest domeniu. *Palade* (1953) a fost primul care a descris prin microscopie electronică în citoplasma celulelor endoteliale vezicule ce traversează celulele dintr-o parte în cealaltă; el a sugerat că aceste vezicule au rol important în transportul macromoleculelor din plasmă în afara patului vascular. O contribuție prioritară aduce *Baciu* și colaboratorii (trecere în revistă, *Baciu*, 1971) demonstrând viteza mare a transportului transendotelial: veziculele (cu diametrul de 40—200 nm) apăreau în primele 30 sec — 2 min de la injectarea tușului de China. Demonstrarea faptului că procesul de veziculizare se produce foarte rapid a fost făcută într-o perioadă în care mulți autori căutau veziculele după câteva ore de la injectarea tușului de China.

Cercetări importante asupra acestui proces au fost făcute în ultimii ani de către *Palade* și colab. (trecere în revistă *Simionescu*, 1983). Transportul în transcitoză poate avea loc fie prin vezicule independente ce se deplasează prin celula endotelială dinspre fața luminală (expusă interiorului vasului) spre fața interstițială (expusă lichidului interstițial), fie, mai rar veziculele fuzionează formînd un canal ce străbate celula.

Transcitoza realizează schimburile între plasmă și lichidul interstițial. Așa cum arăta recent *G. E. Palade* (1985), în transportul macromoleculelor prezintă importanță nu numai dimensiunea, ci și sarcina electrică și proprietățile chimice ale moleculei. Astfel, endoteliul vascular prezintă o distribuție inegală a sarcinilor electrice, cu microdomenii încărcate negativ. Cum și proteinele sînt încărcate negativ, calea preferată de pătrundere va fi prin veziculele de transcitoză. Proprietățile chimice ale macromoleculelor ce vor fi transportate sînt și ele importante, endoteliul vascular (și probabil și alte plasmaleme) poate discrimina proteinele pe baza caracteristicilor chimice ale moleculei. În această discriminare probabil intervin proteine adsorbite pe suprafața plasmalemei. De pildă în cazul celulei endoteliului vascular o proteină numită podocalixină a fost identificată numai pe fața luminală, în zonele în care nu se formează vezicule de transcitoză.

6.6. JONCTIUNILE CELULARE

Jonctiunile celulare sînt structuri stabile situate între celule vecine în care plasmalemele interacționează foarte specific. Se disting trei categorii de jonctiuni celulare speciale (fiindcă și spațiul intercelular poate fi considerat ca o jonctiune simplă), după funcțiile lor: jonctiuni de adezivitate, jonctiuni impermeabile și jonctiuni de comunicare (fig. 6.25.).

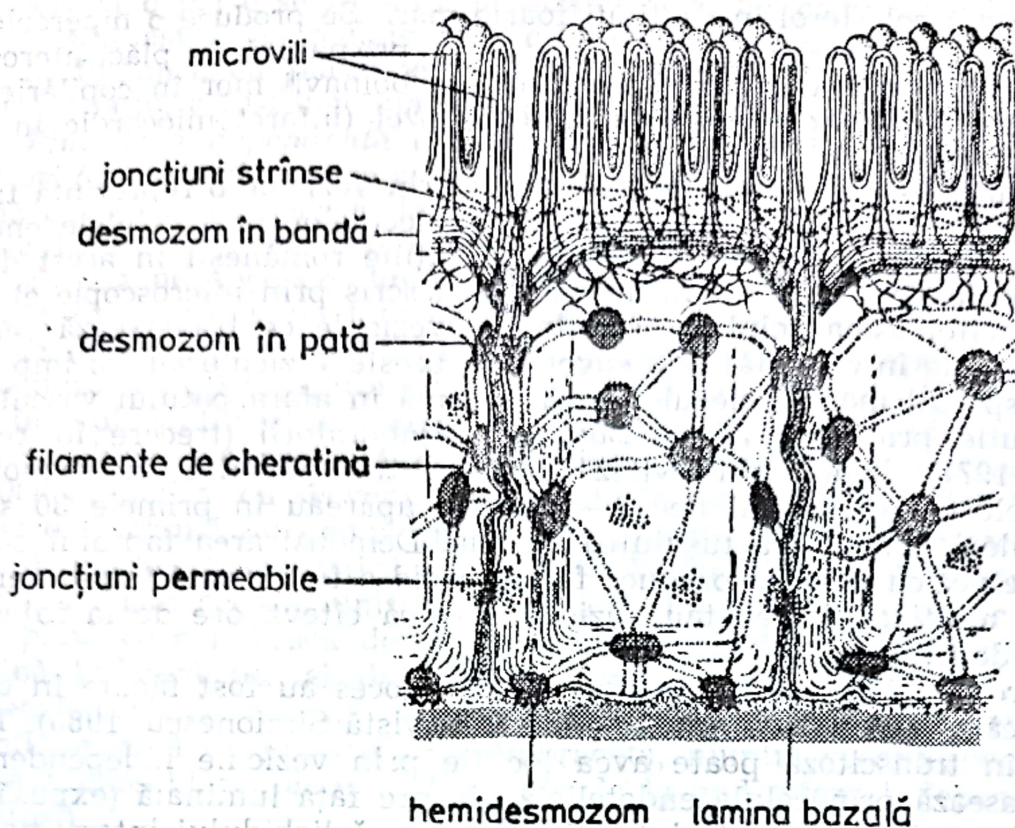


Fig. 6.25. Tipuri de joncțiuni celulare între celulele epiteliale din mucoasa intestinului subțire.

6.6.1. JONCȚIUNI DE ADEZIVITATE: DESMOZOMII

Desmozomii sînt joncțiuni ce mențin laolaltă celulele, dînd astfel rezistență mecanică unor țesuturi ce sînt supuse la forțe mecanice mari: epiteliiile, mușchiul cardiac, colul uterin. Există deci trei forme, întîlnite toate în celulele epiteliale: desmozomii în centură, desmozomii în pată și hemidesmozomii.

a) *Desmozomii în centură* (sau în bandă, „belt desmosomes“) sînt formați dintr-un mănunchi de filamente de actină ce înconjoară într-o bandă capătul apical al celulei epiteliale; benzile dintre toate celulele vecine sînt situate la același nivel, iar între plasmaleme în regiunea benzilor se află un material filamentos ce ține celulele împreună.

b) *Desmozomii în „pată“* („spot desmosomes“) sînt niște regiuni de cimentare intercelulară sub formă rotundă, formate din două discuri dense numite plăci citoplasmatiche, situate sub plasmaleme în cele două celule vecine, și din filamente subțiri ce unesc cele două plăci străbătînd plasmalema și spațiul intercelular. În fiecare placă citoplasmatică se află ancorate (tangențial sau prin capetele lor) filamente de cheratină (tonofilamente). Spațiul intercelular își păstrează grosimea de 20 nm. La microscopul electronic se văd zonele dense corespunzătoare plăcilor și filamentele din spațiul intercelular, precum și tonofilamentele în citoplasmă.

c) *Hemidesmozomii*: au numai o jumătate din structura desmozomului „în pată”, fiindcă unesc suprafața bazală a celulei epiteliale cu lamina bazală (structură specializată a matricii extracelulare). Există deci o placă citoplasmatică și tonofilamentele în celulă, precum și filamentele ce unesc placa, prin plasmalemă, cu lamina bazală.

Desmozomii și hemidesmozomii legind împreună celulele epiteliale realizează distribuirea forțelor mecanice la întregul epiteliu și la țesutul conjunctiv subiacent.

6.6.2. JONCTIUNI IMPERMEABILE: JONCTIUNILE STRINSE

Jonctiunile strinse („tight junctions”) se realizează prin „sudarea” plasmalemelor a două celule vecine, astfel că spațiul intercelular lipsește complet. Ele sînt formate prin proteine joncționale din cele două plasmaleme ce vin direct în contact. Joncțiunile strinse constau din mai multe șiruri de asemenea perechi de proteine, anastomozate, realizînd în ansamblu o centură situată la polul apical al celulelor epiteliale din intestin, deasupra desmozomului în centură (fig. 6.25.).

Prin aceasta se împiedică scurgerea fluidelor printre celule, toate substanțele, inclusiv cele micromoleculare, fiind obligate să treacă prin plasmalemă. De exemplu glucoza este pompată activ din lumenul intestinal în celulă prin suprafața apicală, iar din celulă trece în sînge prin difuziune facilitată, mediată de transportori situați în zonele bazolaterale ale plasmalemei. Joncțiunile strinse nu numai că împiedică retrodifuziunea glucozei din spațiul intercelular în lumenul intestinal (fig. 6.26), dar împiedică și difuziunea celor două categorii de transportori ai glucozei prin stratul dublu lipidic al plasmalemei. Deci joncțiunile mențin domeniile membranelor (în acest caz apical și bazolateral), ceea ce în fond este o *funcție comună a tuturor joncțiunilor celulare*.

Joncțiuni strinse apar în porțiunile apicale ale tuturor celulelor ce delimitează lumenul unor cavități avînd aceeași funcție de a împiedica pătrunderea substanțelor din lumen în spațiile intercelulare.

Un alt exemplu concludent despre rolul joncțiunilor strinse îl constituie *bariera hematoencefalică* realizată de joncțiunile strinse dintre celulele endoteliale ale vaselor din creier. Funcția barierei hematoencefalice este de a proteja creierul de unele substanțe toxice din

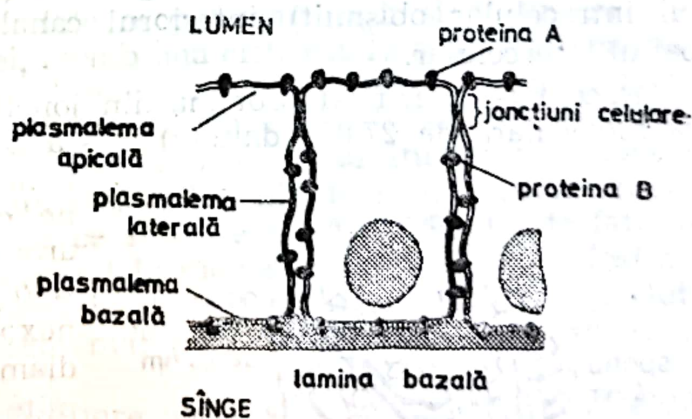


Fig. 6.26. Diagrama reprezentînd bariera pe care o realizează joncțiunile strinse în mucoasa intestinală față de difuziunea substanțelor prin spațiul intercelular pe de o parte și difuziunea proteinelor din membrană între domeniile apical și bazolateral. Proteina A pompează activ glucoza, pe cînd proteina B facilitează difuziunea pasivă.

sînge, permițînd însă trecerea glucozei (principala sursă de energie a creierului) din sînge în creier și trecerea în sens invers a CO_2 rezultat din respirația creierului. Există și toxice care nu pot fi oprite de barieră: alcoolul etilic și morfina. Proteinele nu pot străbate bariera hematoencefalică, în schimb la nou născut precursorii mielinei pot străbate această barieră (este știut că mielinizarea este o expresie a maturizării). Antibioticele folosite în tratamentul infecțiilor sistemului nervos pot fi oprite de barieră, ceea ce creează adeseori dificultăți.

6.6.3. JONCTIUNILE DE COMUNICARE: JONCTIUNILE PERMEABILE ȘI SINAPSELE

Jonctiunile de comunicare mediază trecerea unor molecule mici între două celule care interacționează. În această categorie se disting două tipuri de jonctiuni: jonctiunile permeabile și sinapsele. Jonctiunile permeabile permit trecerea directă a moleculelor mici din interiorul altei celule. Jonctiuni de acest tip există și în cazul sinapselor electrice. În schimb, în cazul *sinapselor chimice* celulele comunică indirect, prin neurotransmițători (secretati de celula presinaptică) ce difuzează prin spațiul sinaptic și se leagă de receptori din membrana celulei postsinaptice.

Jonctiunea permeabilă („gap junction“) este cea mai răspîdită jonctiune, întîlnindu-se în țesuturile tuturor animalelor. Jonctiunile sînt realizate prin structuri proteice numite *conexoni* ce străbat plasmalema și proemină de o parte și de alta a stratului dublu lipidic. Fiecare *conexon* este format din șase subunități proteice permeabile (fig. 6.27).

La formarea jonctiunii permeabile conexonii din cele două celule participante se așază cap la cap, realizînd astfel canale de comunicare între citoplasmele celor două celule. Canalele străbat spațiul intracelular, care este de numai 2—4 nm grosime (deci mult mai îngust ca spațiul intracelular obișnuit), interiorul canalelor fiind complet izolat de spațiul intercelular.

Recent s-a purificat proteina din jonctiunile permeabile (cu greutatea moleculară de 27.000 daltoni) și s-a precizat structura tridimensională a jonctiunii. Fiecare jonctiune constă din sute de conexoni

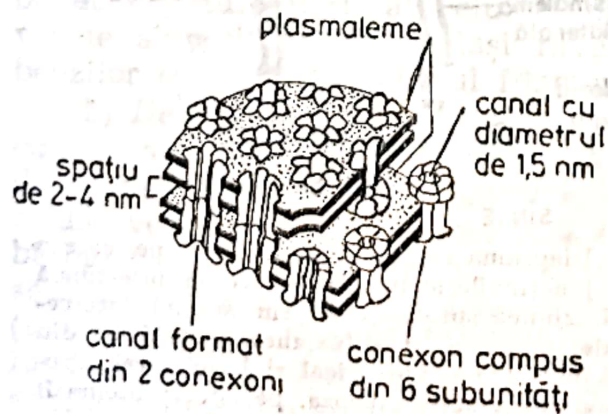


Fig. 6.27. Diagrama jonctiunilor permeabile.

aranjați în planul plasmalemei într-o rețea hexagonală. Fiecare conexon are în mijloc un canal cu diametrul de circa 2 nm, care permite să treacă dintr-o celulă în alta ioni și molecule cu greutatea sub 1000—1500 daltoni: glucide, aminoacizi, nucleotide, hormoni, vitamine. Nu pot să treacă macromoleculele (proteine și acizi nucleici).

Joncțiunile permeabile reprezintă o formă de comunicare între celule, prezentă încă de la spongieri. La organismele superioare și la om au rol în transmiterea influxului nervos în sinapsele electrice, fiind de 10.000 ori mai permeabile pentru ioni metalici decât restul membranei sinaptice. Joncțiunile permeabile mai realizează cuplarea electrică și în miocard și între celulele musculare netede din intestin. Prin aceasta se asigură contracția inimii și de asemenea peristaltismul intestinal.

Astfel de joncțiuni există și între celulele din alte țesuturi: epiteliale și glande salivare, ficat, rinichi, tiroidă, piele etc. Se consideră că prin aceasta se realizează o cooperare metabolică între celule.

Joncțiunile permeabile au caracter dinamic. Creșterea concentrației Ca^{2+} în citoplasma unei celule determină închiderea comunicării cu celelalte celule vecine. Aceasta prezintă importanță medicală deosebită. Astfel, în cazul unei leziuni mecanice a unor țesuturi (piele, ficat), în celulele lezate pătrunde Ca^{2+} din spațiul extracelular; închiderea imediată a comunicării prin joncțiuni permeabile împiedică scurgerea materialului din celulele vecine în cele distruse, deci se previne extinderea leziunilor. Ulterior, în procesul de vindecare a rănilor, se restabilesc joncțiunile permeabile dintre celule. Pe de altă parte, Loewenstein consideră că joncțiunile permeabile între celule pot explica de ce bolile afectează organe întregi sau mari părți ale lor și nu celule individuale. În concluzie, joncțiunile permeabile, deși reprezintă un sistem primitiv de comunicare între celule, își păstrează importanța și la organismele superioare; aici se adaugă însă și alte sisteme de reglare și de integrare a funcțiilor diferitelor celule în țesuturi și în ansamblul organismului.

6.7. MEMBRANA ERITROCITULUI CA MODEL DE PLASMALEMĂ

Având în vedere că eritrocitele se pot izola ușor și că nu au alte membrane în afara plasmalemei, membrana eritocitară a devenit cea mai bine cunoscută dintre toate membranele celulare. Ea conține în proporție aproximativ egală proteine și lipide, iar glucidele se află localizate numai pe fața externă a membranei, intrând în alcătuirea receptorilor și a antigenelor de grup sanguin (fig. 6.28). Lipidele membranei eritrocitare prezintă și ele o asimetrie ce se reflectă în distribuția fosfatidilcolinei și sfingomielinei, predominant în monostratul extern, și a fosfatidiletanolaminei și fosfatidilserinei în cel intern. S-ar părea că și fluiditatea monostratului extern este mai mare decât cea a monostratului intern.

Proteinele membranei eritrocitare, care sînt și ele de două feluri (integrale și periferice) ca în oricare membrană, se recunosc după poziția lor la separarea prin electroforeză în gel de poliacrilamidă și se notează cu numere, începînd de la catod, în ordinea descreșterii greutatei moleculare (Tabel nr. 6.3.).

Dintre *proteinele integrale* cele mai importante sînt: proteina din banda 3, proteinele din banda 4.5 și glicoforinele. Proteina 3 constituie

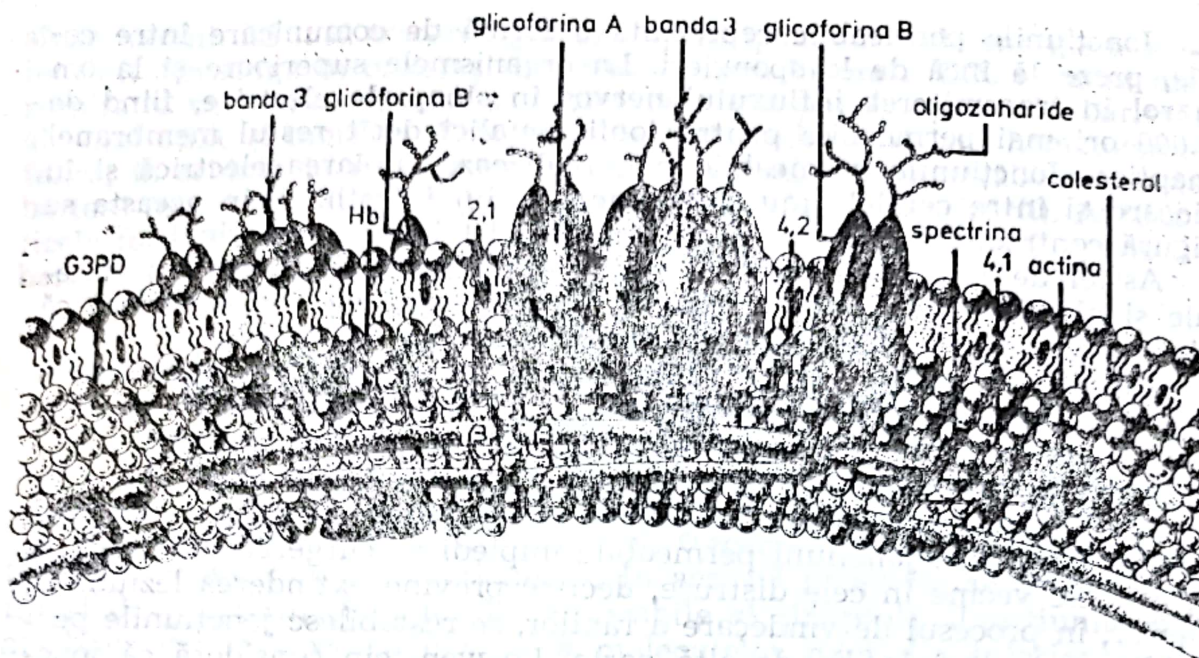


Fig. 6.28. Diagrama structurii membranei eritrocitului uman.

25% din totalul proteinelor membranei, lanțul polipeptidic traversează stratul dublu lipidic al membranei de cel puțin 5 ori, avînd o dispoziție asimetrică, cu capătul N-terminal spre citoplasmă și cu capătul C-terminal în afara celulei sau îngropat în membrană. Particulele intramembranare vizibile prin crio fracturare sînt reprezentate în majoritate de banda 3, probabil sub formă de tetrameri. Această proteină are rol de transport al anionilor, proces important ce asigură îndeplinirea funcției hematiei. La nivelul țesuturilor, din CO_2 rezultat din metabolism, se formează HCO_3^- , care intră în hematie prin schimb cu Cl^- . Transportat la plămîn, HCO_3^- iese din hematie tot prin schimb cu Cl^- , iar CO_2 este eliminat prin expirație.

Proteina 4.5 este transportorul monozaharidelor, deși se discută dacă transportul glucozei nu este cumva efectuat de un fragment din proteina 3 (ce migrează în zona 4.5). Potrivit datelor noastre proteinele 3 și 4.5 mediază și transportul apei prin membrana eritrocitului.

Glicoforinele (sialoglicoproteinele) A, B, și C conțin lanțurile oligozaharidice caracteristice grupelor sanguine și probabil prin sarcinile lor negative au și rolul de a împiedica aglutinarea hematiilor. Sînt implicate în diferențierea celulelor eritroide, iar la îmbătrînirea hematiei reducerea numărului de sarcini negative poate servi ca semnal de recunoaștere în splină, pentru distrugerea hematiilor.

Proteinele periferice ale membranei eritrocitare alcătuiesc o rețea pe fața citoplasmatică, numită *scheletul membranei*, ce reprezintă citoscheletul organizat într-un mod particular. În alcătuirea scheletului membranei intră mai multe proteine.

Spectrina, compusă din două polipeptide localizate în benzile 1 și 2, ce reprezintă două subunități (α și β), este organizată sub formă de tetrameri lungi, formați din aranjarea cap la cap a heterodimerilor compuși dintr-o subunitate α și una β , răsucite una în jurul celeilalte.

Tabel nr. 6.3. Principalele proteine din membrana eritrocitului uman
(după Haest, 1982)

Proteina	Greutate moleculară	Nr. copii/celulă ($\times 10^5$)	starea moleculară	Funcția
1(spectrina) 2(spectrina)	240 000 220 000	2,2	Heterodimeri Tetrameri Oligomeri	Componente ale citoscheletului
2.1(ankirina)	210 000	1,1	Monomer	Leagă citoscheletul de proteinele integrale (proteina 3)
3	95 000	12,0	Tetrameri în echilibru cu dimeri	Transport anioni. Loc de ancorare al citoscheletului
4.1	80 000	2,3	Dimeri?	Proteine de legătură citoschelet-proteine integrale. Interacțiunea spectrină-actină
4.5	59 000	5,7		Transport monozaharide, acid L-lactic, nucleozide
4.9	48 000	1,0		Componentă a citoscheletului
5(actina)	43 000	5,1	Oligomeri (10 monomeri)	Componentă a citoscheletului
6	35 000	4,1	Tetramer	Gliceraldehid 3-fosfatdehidrogenaza
7	29 000			
Glicoforina A	29 000	2,0	Dimer	
Glicoforina B		0,7		
Glicoforina C	25 000	0,35		Loc de legare al citoscheletului
8°	24 000	4,0		

Ankirina (proteina din banda 2.1 sau în caz de digestie și din benzile 2.2, 2.3 și 2.6, numită și *sindeină*) se leagă pe de altă parte de proteina 3.

Proteina din banda 4.1 și actina (banda 5) se leagă de capetele libere ale tetramerilor de spectrină, completând astfel rețeaua de spectrină.

Deci în esență scheletul membranei este realizat dintr-o rețea de tetrameri de spectrină legați între ei prin proteinele 4.1 și actine. Această rețea este legată de proteina 3 prin ankirină. Rolul scheletului membranei este în principal de a menține forma de disc biconcav a eritrociti-

tului, dar și de a asigura flexibilitatea și deformabilitatea sa, esențială pentru ca eritrocitul să poată străbate capilarele sanguine cu diametrul de numai 2 μm .

Există anemii hemolitice prin defecte genetice ale proteinelor din scheletul membranei ducând la instabilitatea lui. Astfel, defecte ale spectrinei (cu scăderea capacității de a forma tetrameri) există în sferocitoza ereditară și piropoichilocitoza ereditară. În eliptocitoza ereditară lipsește ankirina.

Proteine similare spectrinei și ankirinei s-au descris recent și în alte celule (de pildă fodrina în neuron).

Pe lângă interacțiunea cu scheletul membranei, proteinele integrale din membrana eritrocitului, în particular banda 3, mai au asocieri cu hemoglobina și cu enzimele glicolitice, a căror semnificație funcțională rămîne a fi precizată.

6.8. PRIVIRE GENERALĂ ASUPRA IMPLICAȚIILOR MEMBRANELOR ÎN PATOLOGIE

Se poate afirma cu certitudine că nu există boală în care, direct sau indirect, membranele celulare să nu fie afectate. Această idee trebuie subliniată, fiindcă pe plan mondial s-a impus un domeniu distinct „Biomembrane și boli” („Biomembranes and Diseases”), în care studiul mecanismelor moleculare normale ale proceselor de membrană este corelat cu elucidarea modificărilor patologice.

— Cel puțin cîteva din subiectele de interes din domeniul „Biomembrane și boli” pot fi clasificate astfel.

1. Boli de membrană cu defect molecular bine precizat ce afectează un anumit tip de celulă: de pildă anemiile hemolitice datorate lipsei unor componente ale scheletului membranei eritrocitului.

2. Boli de membrană cu caracter generalizat, ce afectează toate membranele organismului, dar boala se manifestă cu precădere într-un anumit organ: de pildă unele tipuri de distrofii musculare.

3. Modificări de structură și funcție a membranelor în boli cronice generale cu etiologie necunoscută: ateroscleroză, cancer, boli neuropsihice.

4. Modificări ale membranelor în infecții virale și microbiene.

5. Modificări de membrană în boli autoimune.

6. Fenomene de membrană în cazul grefelor sau transplantelor.

7. Boli în care sînt implicate membranele organelor celulare (vezi capitolele respective).

8. Interacțiunile medicamentelor cu membranele sau efectele altor procedee terapeutice (hipertermie, ultrasunete, cîmpuri electromagnetice etc.) asupra membranelor.

9. Folosirea modelelor de membrană pentru studiul medicamentului în general.

10. Folosirea membranelor naturale sau artificiale pentru elucidarea mecanismelor anesteziei.

11. Administrarea de medicamente sau enzime încorporate în membrane artificiale (lipozomi) sau naturale (fantome de eritrocite).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Baci, I. Permeabilitatea capilară pentru macromolecule, *Clujul Medical*, 44, 757—770, 1971.
2. Benga Gh., Chapman D., Protein-lipid interactions in biomembranes. I. Albumin-liposome model system-spin label studies, *Rev. roum. Biochim.*, 13, 251—261, 1976.
3. Benga Gh., Morariu V. V., Membrane defect affecting water permeability in human epilepsy, *Nature*, 265, 636—638, 1977.
4. Benga Gh., Pop V. I., Popescu O., Ionescu M., Mihele V., Water exchange through erythrocyte membranes: nuclear magnetic resonance studies of the effects of inhibitors and of chemical modification of human membranes, *J. Membrane Biol.*, 76, 129—137, 1983.
5. Benga Gh., Pop, V. I., Ionescu M., Holmes R. P., Popescu O., Irreversible inhibition of water diffusion through erythrocyte membranes by fluorescein-mercuric acetate, *Cell Biol. Int. Rep.*, 6, 775—781, 1982.
6. Benga Gh., Popescu O., Pop V. I., Holmes R. P., Pavel T., Ionescu M., Modifications of Human Erythrocyte Membranes and their Effect on Water Permeability Studied by a Nuclear Magnetic Resonance Technique, in: *Water and Ions in Biological Systems* (V. Vasilescu, L. Leahu, L. Parcker, Eds.), Plenum Press, 1984.
7. Benga Gh., Strach S. J., Interpretation of the Electron Spin resonance spectra of nitroxide-maleimide-labelled proteins and the use of this technique in the study of albumin and biomembranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 400, 69—79, 1975.
8. Benga Gh., Holmes R. P., Interactions between components in biological membranes and their implications for membrane function, *Progr. Biophys. Molec. Biol.*, 43, 195—257, 1984.
9. Blaustein M. P., Sodium transport and hypertension. Where are we going?, *Hypertension*, 6, 445—453, 1983.
10. Brenner R. R., Effect of unsaturated acids on membrane structure and enzyme kinetics, *Progr. Lipid Res.*, 23, 69—96, 1984.
11. Chapman, D., *Biological Membranes. Physical Fact and Function*, vol. 1—5, Academic Press, London, 1968—1974.
12. Chapman D., Benga Gh., *Biomembrane Fluidity*, in: *Biological Membranes. Physical Fact and Function*, vol. 5 (D. Chapman ed.) Academic Press, London, 1984, pp. 1—55.
13. Cuatrecasas P., Roth T. F. (eds.) *Receptor-Mediated Endocytosis* (Receptors and Recognition, Series B;) vol. 15, Chapman and Hall, London, 1983.

14. Houslay M. D., Stanley K. K., *Dynamics of Biological Membranes. Influence on Synthesis, Structure and Function*, John Wiley & Sons, Chichester, 1982.
15. Hughes R. C., *Membrane Glycoproteins*, Butterworths, London, 1976.
16. Jost P. C., Griffith O. H., *Lipid-protein Interactions*, vols. 1 and 2, John Wiley & Sons, New York, 1982.
17. Kummerow F. A., Benga Gh., Holmes R. P. (eds.), *Biomembranes and Cell Function*, Annals of New York Academy of Sciences, 414, 1983.
18. Marsh D., Spin-label answers to lipid-protein interactions, *Trends Biochem. Sci.*, 8, 330—333, 1983.
19. McCloskey M., Poo M., Protein diffusion in cell membranes: some biological implications, *Int. Rev. Cytol.*, 87, 19—81, 1984.
20. Morariu V. V., Pop V. I., Popescu O., Benga Gh., Effects of temperature and pH on the water exchange through erythrocyte membranes: evidence for state transitions, *J. Membrane Biol.*, 62, 1—5, 1981.
21. Ovchinnikov Yu. A., Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships, *FEBS Letters*, 148, 179—191, 1982.
22. Palade, G. E., The fine structure of blood capillaries, 159 *J. Appl. Physiol.* 24, 1424—1435, 1953.
23. Palade, G. E., Funcțiile multiple ale endoteliului vascular, conf. la workshop: „Evenimente celulare și moleculare în ateroscleroză“, București, 13—16 mai 1985.
24. Pop S., Cuparencu B., Kory M., Safta L., *Receptorii farmacologici*, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1977.
25. Popescu O., Studiul proteinelor din membrana eritrocitelor umane, Teză de doctorat, Univ. din Iași, 1985.
26. Prince R. C., Gunson D. E., Scarpa A., Sting like a bee! The ionophoric properties of melittin, *Trends Biochem. Sci.*, 10, 99 (1985).
27. Rothfield L. I., *Structure and Function of Biological Membranes*, Academic Press, New York, 1971.
28. Simionescu N., Cellular aspects of transcapillary exchanges, *Physiol. Rev.* 63, 1536—1579, 1983.
29. Singer S. V., Nicholson G. L., The fluid mosaic model for the structure of biological membranes, *Science*, 175, 720—731, 1972.
30. Steck T. L., The organization of proteins in the human red blood cell membranes, *J. Cell Biol.*, 62, 1, 1974.
31. Stow J. L., Kjellen L., Unger E., Höök M., Farquhar M. G., Heparan sulfate proteoglycans are concentrated on the sinusoidal plasmalemmal domain and in intracellular organelles of hepatocytes, *J. Cell Biol.*, 100, 975—980, 1985.
32. Wallach D. F. H., Gordon A., Lipid protein interactions in cellular membranes, *Fed. Proc.*, 27, 1263—1268, 1968.

7. NUCLEUL

Este un organit prezent în toate celulele eucariote, avînd în esență două roluri principale: 1) depozitarea informației genetice în ADN-ul nuclear (ce reprezintă majoritatea ADN-ului celulei eucariote), și 2) reglarea și controlul activităților celulei. Deci nucleul este centrul coordonator, de comandă și control al celulei eucariote. Celulele anucleate (hematiile, trombocitele) sînt excepții în corpul uman, fiind incapabile de a sintetiza proteine.

Structura nucleului variază foarte mult în funcție de perioadele ciclului celular. În interfază se descrie nucleul așa numit *metabolic*, avînd la exterior un înveliș nuclear, iar la interior nucleolul, cromatina și carioplasma. În timpul diviziunii celulare, la nucleul așa-numit *genetic*, dispare învelișul nuclear și nucleolul, iar cromatina se condensează devenind vizibili cromozomii (gr. *chroma* = culoare și *soma* = corp), corpusculi cu număr și morfologie caracteristice speciei.

7.1. STRUCTURA NUCLEULUI ÎN INTERFAZA

7.1.1. POZIȚIE, NUMAR, FORMĂ, DIMENSIUNI

Nucleul ocupă de obicei în celulă o poziție centrală (cum este și cazul celulelor tinere). În celulele diferențiate poate fi excentric, cînd în citoplasmă se acumulează substanțe de rezervă (în celulele adipoase), sau deplasat la polul bazal, cînd se acumulează substanțe de secreție la polul apical al celulei (în celulele cu rol predominant secretor).

Număr. Majoritatea celulelor au un singur nucleu, există însă și celule binucleate (cum sînt unele hepatocite ori celulele cartilaginease numite condrocite) sau cu mai mulți nuclei (pînă la 100 în celulele osoase numite osteoblaste). În cazul maselor de protoplasmă ce nu sînt divizate în teritorii celulare, așa-numitele *sincitii* (de exemplu fibra musculară striată), există sute de nuclei.

Forma nucleului corespunde în general formei celulei; este sferic în celulele rotunde (cum sînt și celulele tinere), ovoid în celulele cilindrice sau prismatice, în bastonaș sau fusiform în celulele alungite, sau turtit, în celulele endoteliale sau în cele adipoase și secretoare. Pot exista

și forme neregulate, de exemplu nucleii multilobați din leucocitele neutrofile.

Dimensiunile nucleului variază în funcție de țesut, vârsta celulei, activitatea metabolică. Între volumul nucleului și al citoplasmei există un raport numit raport *nucleo-plasmatic*, care variază în limite largi, între 1/3 și 1/20. Cu cât celula este mai tânără și cu activitate metabolică mai intensă, nucleul este mai mare, iar citoplasma este mai redusă. Celulele degenerate sau îmbătrânite au raportul modificat în favoarea citoplasmei. Deci pe baza raportului nucleo-citoplasmatic, putem stabili dacă o celulă este tânără sau adultă. Acesta este un criteriu important în practica stabilirii diagnosticului de celule maligne (care sînt celule foarte tinere), existînd și alte criterii ce se vor preciza ulterior. Celulele tumorale au raportul nucleoplasmatic foarte mare, unul din criteriile de malignitate. Nucleii celulelor maligne au și morfologie extrem de variată în același câmp microscopic, uneori apărînd monstruoși.

În general dimensiunile nucleului sînt cuprinse între 5—12 μm , cu minimum de 4 μm la spermatozoizi și maximum de 20—25 μm la ovocit.

7.1.2. STUDIUL NUCLEULUI ÎN CELULA VIE

Examinat prin microscopie în contrast de fază, nucleul se prezintă ca o masă sferică delimitată de o membrană, avînd la interior *nucleolul*, un corpuscul foarte refringent. Refringența nucleolului se datorează conținutului său ridicat de materiale solide (ARN și proteine) ce pot atinge pînă la 85%. Dacă membrana nucleară este perforată (prin microdisecție), ea nu se reface, conținutul nucleului amestecîndu-se cu citoplasma, iar celula moare. Spre deosebire de aceasta membrana plasmatică perforată se poate reînchide. Prin microcinematografie s-au evidențiat mișcările nucleului în celulă, mișcări ce pot fi de trei tipuri: mișcările de deplasare împreună cu membrana celulară, mișcările de rotație dependente de mișcările citoplasmatică, precum și mișcările prin care nucleul este expulzat din celulă (nuclei degenerați).

În privința proprietăților fizico-chimice nucleul este mai dens decît citoplasma, ceea ce are importanță în sedimentarea nucleilor la centrifugare, are o vîscozitate mai mică decît a citoplasmei și un pH mai alcalin (7, 6).

7.1.3. STRUCTURA NUCLEULUI (FIXAT) LA MICROSCOPUL OPTIC ȘI ELECTRONIC

Pe secțiuni se disting 4 componente ale nucleului (fig. 7.1): membrana nucleară, cromatina nucleară, nucleolul și carioplasma (sau matricea nucleară). Ultimele trei componente împreună formează *nucleoplasma*.

7.1.3.1. Membrana nucleară (sau învelișul nuclear)

Membrana nucleară (sau învelișul nuclear) prezintă o ultrastructură caracteristică în celulele eucariote, fiind o membrană dublă și prevăzută cu pori. Acest înveliș nuclear este format din două membrane concentrice (sau foițe) aflate în continuitate una cu alta, precum și cu reticulul endoplasmic. Membrana externă a învelișului nuclear se continuă cu reticulul endoplasmic și este prevăzută cu ribozomi; ea este de aceea considerată ca o expansiune a reticulului endoplasmic. Membrana internă este lipsită de ribozomi și este aderentă de nucleoplasmă, deci poate fi considerată ca membrană proprie a nucleului. Avantajul pe care îl prezintă un asemenea sistem de membrană dublă este că cele două membrane sînt specializate în interacțiunea cu citoplasma și, respectiv, nucleoplasma.

În locurile unde foia externă se continuă cu cea internă se formează *porii nucleari* (fig. 7.2.). În regiunile dintre pori între cele două membrane există un *spațiu perinuclear* sau intermembranar de 20—40 nm, ce comunică direct cu lumenul reticulului endoplasmatic. Continuitatea cu reticulul endoplasmic explică modificările rapide ale învelișului nuclear în cursul mitozei, dispariția lui la începutul mitozei și refacerea la sfîrșitul acesteia. Numărul porilor variază cu specia și tipul celular. În general porii reprezintă circa 10% din suprafața învelișului nuclear la mamifere, restul fiind format din membrana dublă.

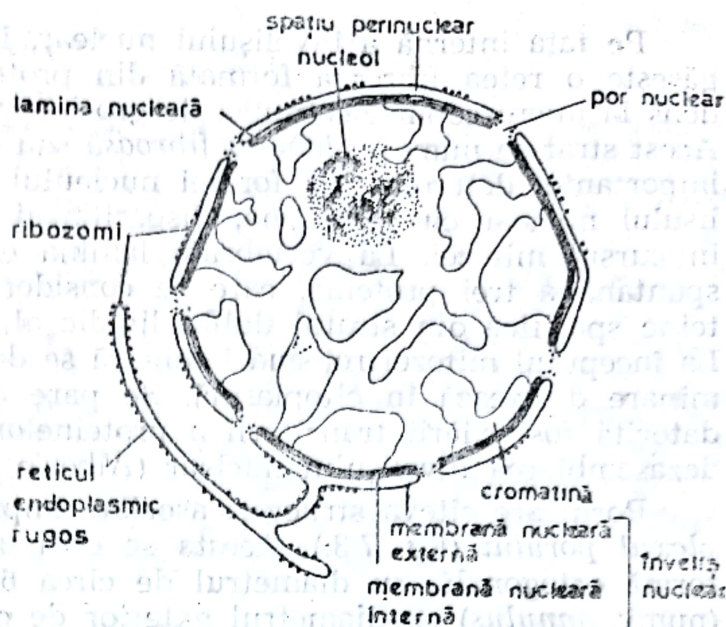


Fig. 7.1. Diagrama structurii nucleului.

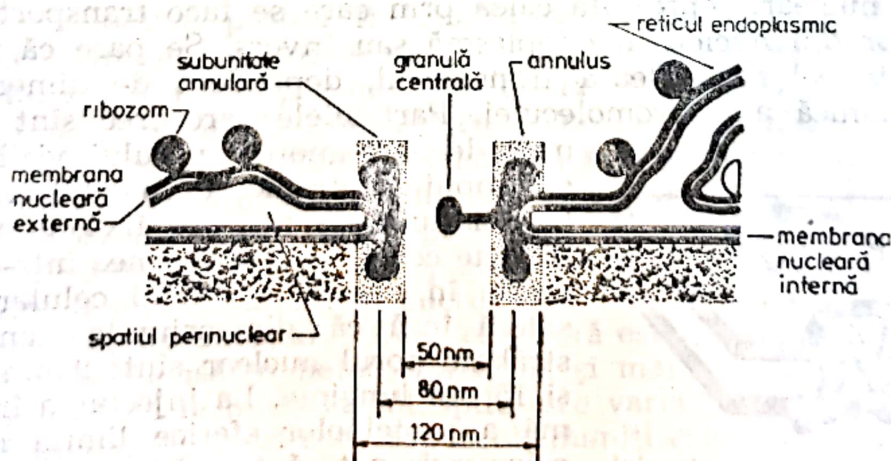


Fig. 7.2. Structura porului nuclear.

Pe fața internă a învelișului nuclear, în zona neocupată de pori, se găsește o rețea fibroasă formată din proteine, care apare ca un strat dens la microscopul electronic, de grosime variabilă în funcție de celulă. Acest strat se numește *lamina fibroasă* sau *lamina nucleară* și are funcții importante: determinarea formei nucleului, medierea interacțiunii învelișului nuclear cu cromatina, dispariția și refacerea învelișului nuclear în cursul mitozei. La vertebrate lamina este formată prin asamblarea spontană a trei proteine, care se consideră că interacționează cu proteine specifice din stratul dublu lipidic al membranei nucleare interne. La începutul mitozei rețeaua laminară se dezassemblează și proteinele laminare difuzează în citoplasmă. Se pare că dezasamblarea se produce datorită fosforilării tranzitorii a proteinelor laminare, ceea ce atrage și dezasamblarea învelișului nuclear (Alberts și colab. 1983).

Porul are câteva structuri asociate împreună cu care formează *complexul porului* (fig. 7.3.). Acesta se compune din porul propriu-zis, de formă octogonală, cu diametrul de circa 60 nm, înconjurat de un inel (numit *annulus*) cu diametrul exterior de circa 120 nm. Inelul este format din opt granule proteice sferoide cu diametrul de 15 nm, care dau forma octogonală a porului. În centrul porului au fost descrise diferite structuri: un diafragm fin, granule centrale, tubuli, care par mai degrabă să reprezinte materiale surprinse în timpul trecerii prin pori decât structuri permanente.

Cele opt proteine din annulus au relații cu lamina și de altfel aceasta se poate izola ca o foiță având atașate complexe de pori nucleari (Dwyer și Blobel, 1976).

Permeabilitatea membranei nucleare joacă un rol important în schimburile dintre nucleu și citoplasmă. În general ionii și substanțele cu greutate moleculară mică (sub 5000 daltoni) pot să treacă prin membrana nucleară. Există însă celule la care membrana nucleară reprezintă o barieră și pentru trecerea ionilor (K^+ , Na^+ , Cl^-). Aceasta este demonstrată de existența unui potențial de membrană la nivelul învelișului nuclear ca și la nivelul plasmalemei, care se pune în evidență prin străpungerea membranei cu microelectrode: în ambele cazuri există o scădere cu -12 mV a potențialului.

Porii nucleari reprezintă calea prin care se face transportul macromoleculelor din nucleu în citoplasmă sau invers. Se pare că materialul anular este cel ce reglează transportul, dependent de dimensiunea și natura chimică a macromoleculei. Particulele care trec sînt mult mai mici decît diametrul porului vizibil la microscopul electronic. Permeabilitatea membranei nucleare nu este fixă, ci variază în diferite celule și de asemenea într-o anumită celulă în funcție de ciclul celular. Se consideră însă că dimensiunile canalului ce străbate porul nuclear sînt: 9 nm diametru și 15 nm lungime. La injectarea în citoplasmă a proteinelor sferice limita maximă a celor care pot să treacă prin porii nucleari este de circa 60.000 daltoni. Prin aceasta

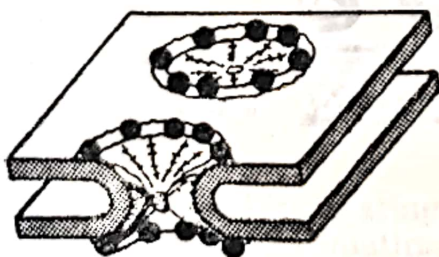


Fig. 7.3. Diagrama complexului porului.

porul împiedică pătrunderea necontrolată a complexelor ce funcționează în citoplasmă (de exemplu ribozomii maturi).

În același timp însă, trebuie subliniat că porii nucleari permit trecerea unor macromolecule sau chiar complexe multimoleculare importante pentru realizarea funcțiilor celulei. Astfel, din citoplasmă sînt „importate” în nucleu enzimele de sinteză a ADN-ului, precum și proteinele ce intră în constituția cromatinei. Dimpotrivă nucleul „exportă” în citoplasmă precursorii ribozomali precum și particulele ribonucleoproteice formate din complexe ale mARN-ului cu proteine speciale. Trecerea unor asemenea ansambluri, avînd mărime mult peste diametrul canalului porului, este posibilă datorită deformării precursorilor ribozomali în cursul transportului prin por, care este și un sistem de transport activ. Pe de altă parte ADN și ARN polimerazele (cu greutate moleculară de 100.000—200.000 daltoni) trec prin por fie prin adoptarea unei conformații alungite, fie interacționînd cu o proteină receptor din marginea porului, care le transportă prin lărgirea canalului din por.

7.1.3.2. Cromatina nucleară

Cromatina este substanța din care sînt formați cromozomii și este în esență compusă din filamente de ADN complexat cu proteinele numite histone.

Cromatina nucleară în interfază nu este altceva decît forma relaxată, extinsă, desfășurată, a cromozomilor. În timpul diviziunii celulare cromatina se reorganizează, formînd structurile condensate caracteristice ale cromozomilor. Deci cromozomii sînt prezenți tot timpul în nucleu, dar nu sînt vizibili la microscopul optic sub forme caracteristice decît în timpul diviziunii celulare cînd sînt complet condensați.

Cromatina se colorează intens cu coloranții bazici (hematoxilină, albastru de tripan), datorită conținutului mare de ADN. Se prezintă în interfază sub două aspecte tinctoriale: o rețea de filamente foarte fine slab colorate ce formează *euromatina*, sau sub formă mai condensată, colorată puternic, formă care se numește *heterocromatină*. Uneori heterocromatina se înfățișează sub forma unor corpusculi, numiți *cromocentri* sau *cariozomi*. Heterocromatina este inactivă metabolic, în schimb, euromatina este activă putînd fi folosită pentru sinteza de ARN. Deci numai genele din euromatină se exprimă fiindcă numai euromatina poate fi transcrisă (vezi și capitolele 8—12). De aceea raportul celor două tipuri de cromatină, intensitatea colorației cromatinei în nucleu variază în funcție de activitatea metabolică a celulelor respective. Dacă predomină euromatina (deci nucleul este hipocrom) înseamnă că nucleul este foarte activ metabolic. Dacă predomină heterocromatina înseamnă că este relativ inert metabolic. Din punctul de vedere al compoziției biochimice între heterocromatină și euromatină nu există deosebiri, fiind vorba deci de aceeași substanță. Ceea ce diferă este gradul de spiralizare, împachetare, mai densă în heterocromatină și mai laxă în euromatină. Aspectul cromatinei la microscopul optic este variat: se descriu granule, rețea de filamente, grămezi sau corpusculi numiți *cromocentri* sau *cariozomi*.

Se descriu două forme de heterocromatină: constitutivă și facultativă. *Heterocromatina constitutivă* este condensată în permanență în interfază și în mod constant în toate tipurile de celule dintr-un organism, deci care nu va fi transcrisă în ARN niciodată. Dimpotrivă, *heterocromatina facultativă* este condensată numai în anumite tipuri de celule și în anumite perioade ale dezvoltării. Deci genele de pe această heterocromatină nu sunt exprimate într-o anumită perioadă, dar pot fi folosite pentru sinteza de ARN și deci pentru exprimarea genelor dacă heterocromatina facultativă se transformă în eucromatină. Din heterocromatina facultativă face parte și formațiunea descrisă în 1949 de Barr și Bertram, numită *cromatina sexuală* sau *corpusculul Barr*. Are o formă triunghiulară sau semicirculară, cu baza de obicei lipită de suprafața internă a membranei nucleare și vârful sau convexitatea îndreptată spre centrul nucleului. Cromatina sexuală este o caracteristică a sexului feminin. Ea se pune în evidență în celulele mucoasei bucale. Apare în proporție de cel puțin 20% la femei, în timp ce la bărbatul normal este absentă. Ea reprezintă unul din cromozomii de sex feminin (X), inactiv din punct de vedere genetic. Determinarea cantitativă a corpusculului Barr este folosită în diagnosticul unor anomalii cromozomiale.

La bărbați, tot pe frotiul de celule ale mucoasei bucale, se pot identifica prin microscopie de fluorescență, după colorare cu chinacrină, un corpuscul intens fluorescent. Acesta corespunde *cromozomului Y* (de sex masculin), numit și *corpusculul F*, descoperit în 1970 de Pearson. Servește la diagnosticul unor anomalii cromozomiale, cum este de pildă prezența a doi cromozomi Y.

La microscopul electronic eucromatina se prezintă sub forma unor fibre de circa 20—30 nm diametru, care formează o rețea. Unele fibre se fixează de membrana nucleară la nivelul regiunii anulare. Fibrele nu au diametrul constant, ci prezintă umflături pe traiectul lor, care corespund unor zone în care cromatina este înfășurată mai dens.

7.1.3.3. Nucleolul

Nucleolul se găsește în toate celulele eucariote cu excepția celulelor embrionare, unde lipsește atâta vreme cât embrionul se hrănește cu vitelus (când nu există încă sinteză proprie de proteine). Nucleolul se poate vedea în nucleul din interfază, dispare la începutul mitozei și re apare la sfârșitul acesteia.

Observat în 1836 de *Valentin* ca o granulă densă în interiorul nucleului, asocierea nucleolului cu activitatea sintetică a celulei a fost postulată la sfârșitul secolului XIX, când s-a observat că nucleolul este mare în celulele secretorii și în ovocite și dimpotrivă este mic sau absent în celule musculare sau spermatozoizi. (De Robertis și De Robertis, 1980).

Abia după 1960 s-a precizat că nucleolul joacă un rol esențial în biogeneza ribozomilor. În nucleol se sintetizează ARN-ul ribozomal de care se atașează proteinele ribozomale venite din citoplasmă. În acest fel se formează precursori ai ribozomilor, care trec apoi prin porii nucleari în citoplasmă, unde se maturează, formându-se ribozomii capabili

de a sintetiza proteine. Sinteza ARN-ului ribozomal se face pe anumite zone din unii cromozomi, zone numite *organizatori nucleolari*. La om există 5 perechi de cromozomi cu organizatori nucleolari, care controlează formarea nucleolilor la sfârșitul mitozei, când se formează într-adevăr 5 nucleoli, dar aceștia fuzionează și de aceea în majoritatea celulelor există în interfază un singur nucleol în nucleu.

Având în vedere cele de mai sus putem înțelege morfologia și ultrastructura nucleolului. Acesta nu este delimitat prin membrane de restul nucleului, ci apare la microscopul optic în celula fixată ca un corpuscul bazofil, care se colorează cu pironină (datorită ARN-ului) și nu se colorează cu metoda Feulgen. Uneori nucleolul apare înconjurat de un inel de heterocromatină Feulgen-pozitivă, iar nucleolii mari pot prezenta și granule Feulgen-pozitive la interior. Nucleolul are dimensiuni de 1—2 μm , are o formă rotundă sau ovală, iar poziția sa în interiorul nucleului poate varia în funcție de starea funcțională a celulei. De obicei ocupă însă o poziție centrală sau paracentrală.

La microscopul electronic se pot observa trei zone componente ale nucleolului: a) componenta granulară, formată din particule cu diametrul de 15—20 nm, ce reprezintă precursorii ribozomilor și este componenta dominantă; b) componenta fibrilară, formată din fibre fine cu diametrul de circa 5 nm, formată din ADN-ul pe care se sintetizează ARN-ul ribozomal și din produsul primar al acestei sinteze (ARN 45 S); c) componenta amorfă ce umple spațiul dintre granule și fibre, despre care se discută dacă este componentă propriu-zisă sau doar suc nuclear ce umple spațiul dintre celelalte componente. Aranjarea componentelor granulară și fibrilară este variabilă, dar în general cea fibrilară este în regiunea centrală, iar cea granulară la periferia nucleolului. În sfârșit, nucleolul este înconjurat de cromatină, considerată de unii autori ca o a patra componentă a nucleolului.

În privința compoziției chimice nucleolul conține trei componente principale: ADN, ARN și proteine, în proporție de aproximativ 30%, 70% și respectiv, 90% din greutatea uscată. ADN-ul este reprezentat de organizatorii nucleolari ce pătrund ca niște bucle de ADN în nucleol (fig. 7.4). ARN-ul este în principal ARN ribozomal aflat în diferite faze de maturare (vezi biogeneza ribozomilor). Se presupune că nucleolul ar fi și o stație intermediară în tranzitul spre citoplasmă al ARN-ului mesager și al celui de transfer (Diculescu și colab., 1983). Proteinele nucleolare vin din citoplasmă și sînt reprezentate de unele enzime de sinteză a ARN-ului, precum și de proteinele ribozomale și alte enzime. Datorită concentrației mari de substanță uscată nucleolul este structura cea mai densă din celulă (densitatea 1,35).

Funcția principală a nucleolului este legată de biogeneza ribozomilor prin sinteza de rARN și stocarea precursorilor ribozomali

10 cromozomi extinși în interfază ce contribuie la producerea de ADN din nucleol (gene pentru rARN)

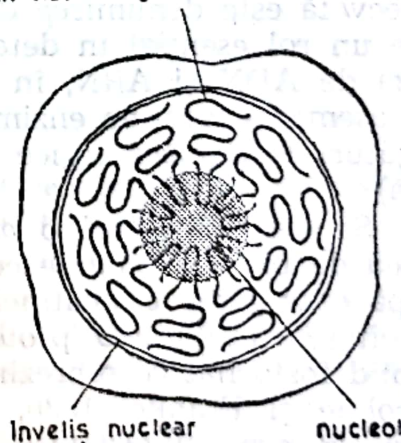


Fig. 7.4. Buclele de cromatină cu genele pentru rARN ce intră în alcătuirea nucleolului.

înainte de a fi trecuți în citoplasmă. Se mai atribuie nucleolului și funcțiile de stație de tranzit în transmiterea mARN și tARN în citoplasmă, precum și de pregătire a mitozei, după cum reiese din experiențe de distrugere a nucleolului. În orice caz nucleolul este o componentă esențială a celulei. S-au descoperit mutante de broască (*Xenopus laevis*) fără nucleol, care nu sînt viabile, mormolocii murind la vîrsta de o săptămînă (De Robertis și De Robertis, 1981).

Avînd în vedere rolul nucleolului în biogeneza ribozomilor (componentele celulei ce sintetizează proteinele) se înțelege că numărul și mărimea nucleolilor sînt în funcție de starea funcțională a celulei. Există un raport între volumul nucleolului și al nucleului, numit raport *nucleolo-nuclear*. În general nucleolul ocupă circa 30% din volumul nucleului. Însă cu cît celula este mai activă în sinteza proteinelor cu atît raportul nucleolo-nuclear este mai mare. De aceea raportul nucleolo-nuclear este un alt criteriu important în stabilirea vîrstei celulei și în determinarea malignității celulei. Caracterile de celulă tînă sînt: nucleu mare, nucleu eucrom, nucleol mare (sau nucleoli multipli), citoplasma redusă și bazofilă. Invers, caracterile de celulă adultă sînt: nucleu mai mic, hiperrom, nucleoli mici sau nucleol unic, citoplasmă abundentă. În celulele canceroase nucleolii sînt mari, hipertrofiați, diametrul fiind 1/3 din cel al nucleului sau chiar peste această valoare. De multe ori gradul de hipertrofie al nucleului este proporțional cu gradul de malignitate al tumorii. În aceeași relație poate fi și numărul nucleolilor, alt criteriu important, citîndu-se și cazuri de tumori cu peste 20 nucleoli pe nucleu. În sfîrșit, forma neregulată a nucleolului face și ea parte dintre criteriile de stabilire a diagnosticului de celulă canceroasă.

7.1.3.4. Carioplasma (sucul nuclear, matricea nucleară)

Carioplasma sau *sucul nuclear* este partea nucleului lipsită aparent de structură (la microscopul optic și electronic) în care se află cromatina și nucleolul. Denumirea de suc nuclear nu este corespunzătoare, deoarece la nivel molecular și carioplasma este structurată. Probabil mai adecvată este denumirea de *matrice nucleară*. Această parte a nucleului are un rol esențial în determinarea formei nucleului, precum și în sinteza de ADN și ARN, în medierea efectelor unor hormoni (steroidi) și de asemenea conține enzime pentru sinteza NAD, pentru formarea unor legături fosfatmacroergice și enzime ale metabolismului anaerob (glicoliză).

Se descrie uneori o *matrice nucleară propriu-zisă*, formată dintr-o rețea de proteine stabile cu greutate moleculară mare, ce se poate izola după extragerea cromatinei și a nucleolului. (Ar fi echivalentul nuclear al citoscheletului). O proteină recent descrisă este *nucleoplasmina*, un peptid fosforilat ce reprezintă circa 10% din totalul proteinelor nucleare (Krohne și Franke, 1980, Dingwall și colab., 1982). Tot din matricea nucleară propriu-zisă face parte și *lamina nucleară* sau *fibroasă*, aflată, așa cum s-a spus, pe fața internă a învelișului nuclear.

Pe de altă parte se mai descrie o *fracțiune labilă a matricei* (Diculescu și colab., 1983), legată lax de matricea propriu-zisă, dar interacțio-

nind și cu cromatina și nucleolul. În fracțiunea labilă se găsesc o serie de proteine solubile cu greutate moleculare mici, enzime, ATP, ioni și apă.

Cea mai mare parte a proteinelor din matricea nucleară (atât în matricea propriu-zisă cât și în fracțiunea labilă) o reprezintă *proteinele nehistonice*, foarte heterogene ca masă moleculară (între 10.000—300.000 daltoni). În mod „clasic” proteinele nehistonice erau considerate drept „cromozomiale nehistonice” și erau considerate proteine acide. De fapt sînt heterogene și ca particularități chimice (există atât proteine acide, cât și neutre sau bazice). Au turnover-ul foarte rapid, multe dintre ele conțin triptofan, un aminoacid aromatic, spre deosebire de histone. Proteinele nehistonice reprezintă aproximativ 45% din proteinele nucleilor hepatici. Unele din proteinele nehistonice au rol important în structura cromatinei, altele în reglarea exprimării genelor (vezi capitolele 8 și 12), dar din această clasă heterogenă fac parte și enzime ca nucleazele, ADN- și ARN polimerazele, proteinkinazele.

Trebuie subliniat că matricea nucleară este o structură dinamică, prezentînd contractilitate, dependentă de cationii bivalenți (Ca^{2+} , Mg^{2+}) și nu de ATP. Volumul nuclear se poate modifica prin variațiile de concentrație ale cationilor bivalenți, dar și ale ionilor monovalenți. În legătură cu aceasta este de remarcă că există diferențe între concentrațiile de Na^+ și K^+ în nucleu față de citoplasmă. Na^+ este în concentrație mai mică, iar K^+ în concentrație mai mare decît în citoplasmă. De asemenea conținutul de apă al matricei nucleare este mai mare (ajungînd pînă la 89%) decît al citoplasmei (unde are valori de circa 50%). La fel, și conținutul de ATP al nucleului este mai mare ca cel al citoplasmei (Horowitz și Miller, 1984).

Dinamismul matricei nucleare se reflectă și în distribuirea în citoplasmă a proteinelor matricei nucleare în timpul mitozei și în refacerea matricei după diviziune.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Dingwall C., Sharnick S. V., Laskey R. A., A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus, *Cell*, 30, 449—458, 1982.
2. Dwyer N., Blobel G., A modified procedure of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei, *J. Cell Biol.*, 70, 581—591, 1976.
3. Krohne G., Franke W. W., Immunological identification and localization of the predominant nuclear protein of the amphibian oocyte nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1034—1038, 1980.
4. Horowitz S. B., Miller D. S., Solvent properties of ground substance studied by cryomicrodissection and intracellular reference-phase techniques, *J. Cell Biol.*, 99, 172—179, 1984.

8. CROMOZOMII LA EUCARIOTE

8.1. FUNCȚIILE ÎN CELULE

Cromozomii sînt structuri celulare care la o anumită specie apar în număr constant și au forme și mărimi caracteristice. *Flemming* a descoperit în 1882 faptul că în cursul diviziunii celulare cromatina se condensează sub formă de bastonașe și apoi se clivează în sens longitudinal. Denumirea de cromozomi a fost dată de *Waldeyer* în 1888. Deși au fost descoperiți de 100 de ani, abia în secolul nostru s-a demonstrat rolul important al cromozomilor în transmiterea ereditară a caracterelor. *Ereditatea* este însușirea organismelor vii de a produce urmași asemănători în anumite condiții de dezvoltare. Caracterele organismelor (de exemplu culoarea ochilor și a părului la om) se transmit la urmași deoarece ele sînt determinate de genele localizate în cromozomi, care se transmit de la o generație la alta. Una din marile descoperiri ale biologiei contemporane o constituie precizarea naturii materiale, biochimice, a genei. Genele sînt constituite din acizi nucleici, care reprezintă deci *materialul genetic*, suportul material al eredității. Fiecare specie și fiecare individ are propriul său *program genetic* înscris în genele din cromozomi, prin care se transmit ereditar caracteristicile morfologice, fiziologice, biochimice etc. Materialul genetic este reprezentat la marea majoritate a viețuitoarelor de către ADN, numai la unele virusuri (la cele care nu conțin ADN) este reprezentat de ARN. Gena este o porțiune din molecula de acid nucleic, iar *informația genetică* este stocată în genă sub formă codificată, reprezentată de secvența bazelor nucleotidice din molecula de acid nucleic. O genă cuprinde 300—1500 nucleotide.

Cromozomii conțin majoritatea materialului genetic al celulei, fiind vehiculele pentru stocarea, transmiterea, exprimarea și evoluția informației genetice. În afara cromozomilor se mai găsește material genetic în celula eucariotă animală numai în mitocondrii, iar la plante și în cloroplaste. Deoarece genele sînt localizate în cromozomi, înțelegem de ce am spus că ei servesc la stocarea informației genetice. *Transmiterea informației genetice* se realizează prin următorul mecanism: în faza S a ciclului celular se produce replicarea ADN-ului, proces prin care se dublează cantitatea de ADN din cromozomi, ADN-ul nou sintetizat fiind o replică, o copie a secvenței de nucleotide din ADN-ul inițial, deci conține aceeași informație genetică; în cursul diviziunii celulare ADN cromozomial se împarte în mod egal celor două celule fiice, care vor avea deci aceeași informație genetică ca și generația precedentă. *Exprimarea (sau expresia) informației genetice* se face prin biosinteza proteinelor. În general fiecare genă este răspunzătoare de sinteza unui lanț polipep-

tidic specific. Genele acționează prin controlarea secvenței aminoacizilor din proteine. Acest proces depinde în esență de copierea secvenței de nucleotide de pe o genă pe o moleculă de ARN (proces numit *transcriere*) și apoi de *traducerea* informației genetice în sinteza unor proteine specifice. Deci exprimarea informației genetice cuprinde transcrierea și traducerea. În esență, informația genetică este informația care specifică secvența aminoacizilor din proteine și este reprezentată de secvența nucleotidelor din acizii nucleici.

Transmiterea informației genetice se reprezintă prescurtat sub forma următoare; numită *dogma centrală a biologiei moleculare*:

autoreplicare $\rightarrow$ ADN $\xrightarrow{\text{transcriere}}$ ARN $\xrightarrow{\text{traducere}}$ proteine.

Studiul cromozomilor și al genelor aduce confirmări strălucite ale concepției materialist-dialectice despre lume. S-a demonstrat că ereditatea nu are în ea nimic supranatural, ci are un substrat material reprezentat de acizii nucleici. Gena nu are nimic misterios, ci este o porțiune din molecula de ADN. Mai mult, întreaga viață de pe Pământ are un caracter unitar, toate viețuitoarele, de la virusuri până la om, au același substrat material al eredității și același mecanism de înregistrare a informației genetice în acizii nucleici. Tot genetica modernă a mai demonstrat că evoluția nu este rezultatul unor factori supranaturali, ci s-a realizat în primul rând la nivelul genelor. În sfârșit, după ce s-a reușit izolarea genelor, sinteza lor artificială, transferul artificial de gene, conturându-se ingineria genetică, nu mai poate fi pusă la îndoială materialitatea fenomenelor eredității.

8.2. CROMOZOMII LA EUCARIOTE: MORFOLOGIE, ULTRASTRUCTURĂ, ORGANIZARE MOLECULARĂ

8.2.1. CARACTERE MORFOLOGICE GENERALE ALE CROMOZOMILOR

În timpul diviziunii celulare cromozomii se condensează luând aspecte morfologice caracteristice în diferitele faze ale diviziunii.

În anafază (a treia fază a diviziunii) cromozomii se prezintă sub forma unor bastonașe ce se colorează intens cu coloranți bazici și prin metoda Feulgen. Pe traiectul cromozomilor există o zonă ce nu se colorează și de aceea dă impresia unei constricții. Această zonă este numită *centromer* (sau *constricție primară*). Centromerul este zona prin care cromozomul se fixează de fibrele fusului de diviziune. Centromerul împarte cromozomul în două brațe. După poziția centromerului cromozomii se împart în patru categorii (fig. 8.1.):

— *telocentrici*: la care centromerul este situat chiar la capătul cromozomului;

— *acrocentrici*, la care centromerul este situat aproape de capătul cromozomului (cromozomul are forma unui bastonaș, ca și cel telocentric). Unii autori includ în cromozomii acrocentrici și pe cei telocentrici;



Fig. 8.1. Cele 4 tipuri de cromozomi după poziția centromerului: a: telocentrici; b: acrocentrici (unii autori includ în această categorie și cromozomii telocentrici); c: submetacentrici; d: metacentrici.

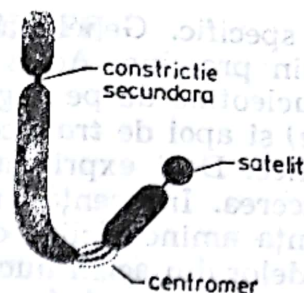


Fig. 8.2. Diagrama unui cromozom indicând centromerul, constricțiile secundare și satelitul.

— *submetacentrici*, la care centromerul este situat aproape de centrul cromozomului (există un braț lung și unul scurt, cromozomul avînd forma literei L);

— *metacentrici*, la care centromerul este situat la mijlocul cromozomului (cele două brațe sînt egale, cromozomul avînd forma literei V).

Majoritatea cromozomilor sînt *monocentrici*, adică au un singur centromer. Există uneori însă, în special în anomaliile cromozomiale, și cromozomi *dicentrici* (cu doi centromeri) sau *policentrici* (cu mai mulți centromeri).

Pe lângă centromeri, alte caracteristici morfologice ale cromozomilor, utile în identificarea lor în practica citogenetică, sînt următoarele: (fig. 8.2).

a) *Constricțiile secundare*: pot fi distribuite în lungul cromozomului și se disting de constricțiile primare prin faptul că la nivelul lor nu apar deviații angulare ale segmentelor pe care le unesc. Zone de constricții secundare sînt și cele asociate cu formarea nucleolilor, numite *zone nucleolare sau organizatori nucleolari*. Cromozomii ce participă la producerea nucleolilor se numesc *cromozomi nucleolari* (la om sînt 5 perechi de asemenea cromozomi).

b) *Satelitul*: este un corp rotund cu diametrul egal cu al cromozomului sau mai mic, legat de restul cromozomului printr-un filament subțire de cromatină, cu lungime variabilă. Cromozomii ce au sateliți se numesc *SAT-cromozomi*.

8.2.2. CARIOTIPUL: NUMĂRUL ȘI MORFOLOGIA CROMOZOMILOR ÎN METAFAZĂ. CARIOTIPUL UMAN. NOȚIUNI DESPRE ANOMALIILE CROMOZOMIALE

În metafază (a doua fază a diviziunii celulare) fiecare cromozom apare format din două *cromatide* fiice unite la nivelul centromerului. Fiecare cromatidă are de fapt cîte un *cinetocor* ca loc de atașare pe microtubuli fusului de diviziune. (Uneori se consideră noțiunea de cinetocor sinonimă cu cea de centromer. Dar fiecare centromer, ca loc de unire a cromatidelor, are doi cinetocori.) După desprinderea celor două

cromatide, în faza următoare a diviziunii celulare (anafaza), se vor forma doi cromozomi identici care se distribuie câte unul fiecareia din celulele fiice rezultate din diviziune.

Dacă însă celula este tratată cu colchicină (un alcaloid ce blochează asamblarea fusului de diviziune), se produce oprirea diviziunii celulare în metafază. În acest fel devine posibilă studierea aspectului cromozomilor în scopul diagnosticării anomaliilor cromozomiale, boli ereditare de obicei foarte grave. Deci studiul aspectului cromozomilor în metafază prezintă importanță medicală deosebită. Numărul și morfologia cromozomilor în metafază formează *cariotipul* unui organism. Cariotipul este o constantă a speciei, adică numărul, forma, dimensiunile și alte caracteristici morfologice sînt identice în celulele unui organism și la toate organismele de aceeași specie. De exemplu la om se întîlnesc 46 cromozomi, la *Drosophila* 8, la grîu 14 etc.

În toate celulele somatice ale organismelor eucariote există câte două exemplare din fiecare cromozom, unul fiind de origine maternă, iar celălalt de origine paternă. Există deci perechi de cromozomi.

Numărul de perechi de cromozomi caracteristici speciei se notează cu n . La om $n = 23$, la nematodul *Ascaris megalocephala univalens* $n = 1$. Celulele somatice au $2n$ cromozomi, pe cînd celulele sexuale (sau gameții), adică spermatozoidul și ovulul au numai n cromozomi. De aceea celulele somatice se numesc *diploide*, pe cînd gameții se numesc celule *haploide*; la om celulele sexuale au 23 cromozomi, pe cînd celulele somatice au 46 cromozomi.

Numărul de 46 cromozomi ai omului a fost precis determinat abia în 1956 de *Tjio* și *Levan* și, independent, de *Ford* și *Hamerton*. Cei 46 cromozomi se împart în două categorii: 44 *cromozomi autozomi* (22 perechi) și 2 *cromozomi de sex* (sau heterocromozomi), care determină sexul. Astfel, în celulele somatice la femeie există doi cromozomi X, pe cînd la bărbat există un cromozom X și unul Y. Formula cromozomială este deci la femeie: 46, XX și la bărbat 46, XY. În formula cromozomială prima cifră indică numărul total de cromozomi, după virgulă fiind indicați cromozomii de sex.

Fiecare din cele 22 perechi de autozomi este formată din 2 cromozomi omologi, adică cromozomii ce au aceeași morfologie și aceeași poziție a genelor. Spre deosebire de aceasta cromozomii de sex nu sînt omologi. La bărbat diferența între cromozomul X și Y este clară chiar morfologic. La femeie cei 2 cromozomi X nu sînt omologi, deoarece numai unul este activ genetic, celălalt este inactiv și rămîne condensat în interfază, formînd cromatina sexuală (corpusul Barr). Diferențierea celor 2 cromozomi X într-unul activ și altul inert genetic se face într-un stadiu precoce al dezvoltării embrionare. Oricare din cei doi cromozomi X poate să se inactiveze, dar odată apărută diferențierea celor doi cromozomi X, aceasta se menține la toate diviziunile celulare ulterioare. Se înțelege deci că numărul de cromozomi X este egal cu numărul de corpusculi Barr plus 1. Deci la toți bărbații normali existînd un singur cromozom X, care este în mod obligatoriu activ, lipsește corpusul Barr. Apariția cromatinei sexuale la bărbați sau prezența a 2 sau 3 corpusculi Barr la femei denotă anomalii cromozomiale de sex. De exemplu, la femeile 47, XXX sau la bărbații 48, XXXY există 2 corpusculi

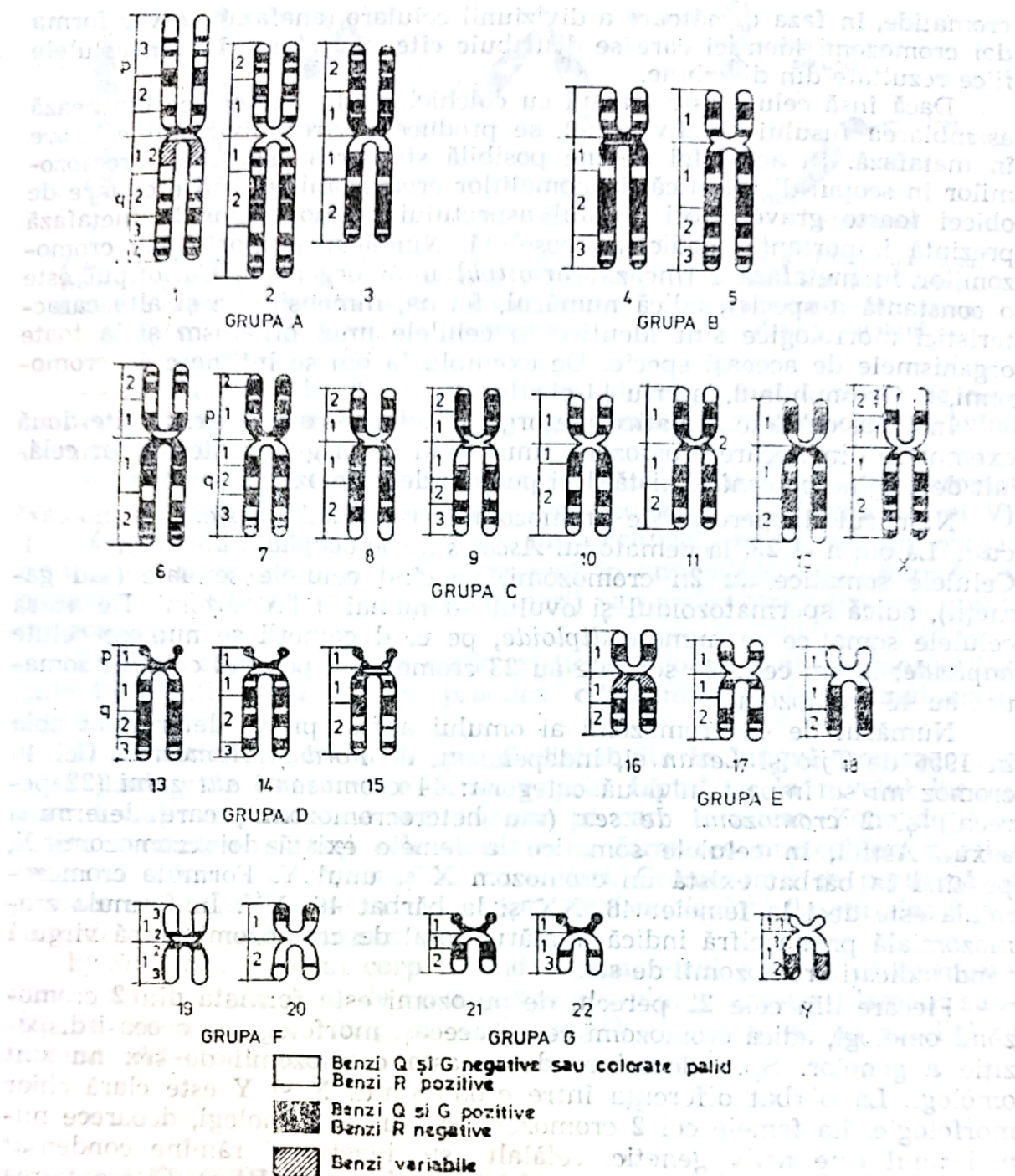


Fig. 8.3. Cariotipul uman (idiograma normală a omului cu reprezentarea benzilor cromozomiale).

Barr, iar la bărbații 47, XXY (sindromul Klinefelter) apare un corpusul Barr. Dimpotrivă, absența corpusculului Barr la femei denotă un cariotip 45, X (cum se întâlnește în majoritatea cazurilor de sindrom Turner).

Clasificarea și nomenclatura cromozomilor umani se face după sistemul internațional adoptat în 1960 la Denver (cu modificările ulterioare aduse la Londra în 1963, Chicago în 1966, Paris în 1971). Criteriile de clasificare sînt: lungimea, poziția centromerului și particularitățile mor-

fologice ale cromozomului. S-au stabilit 7 grupe mari, numite A, B, C, D, E, F, G, în ordinea descrescândă a lungimii cromozomilor. Din fiecare grupă fac parte mai multe perechi de cromozomi, notate cu cifre arabe, în ordinea descrescândă a lungimii. Cei mai lungi cromozomi sînt perechea 1 (10 μ m) și cei mai scurți perechea 22 și cromozomul Y (1,5 μ m). Clasificarea cromozomilor umani este următoarea:

- grupa A: perechile 1—3
- grupa B: perechile 4—5
- grupa C: perechile 6—12 și cromozomul X (deci cuprinde 15 cromozomi la bărbat și 16 la femeie)
- grupa D: perechile 13—15
- grupa E: perechile 16—18
- grupa F: perechile 19—20
- grupa G: perechile 21—22
- cromozomul Y este clasificat separat. (fig. 8.3.).

Determinarea cariotipului (fig. 8.4.) se face în majoritatea cazurilor pe limfocite, separate din sînge venos recoltat pe heparină. După recoltare se așteaptă pînă sedimentează hematii, apoi se ia plasma bogată în limfocite și se introduce în flacoane cu medii pentru culturi de celule, la care se adaugă și *fitohemaglutinine* (glicoproteine vegetale ce stimulează diviziunile celulelor). După trei zile de incubare la 37°C se blochează diviziunile celulelor în metafază prin adăug de colchicină (2), apoi celulele sînt separate prin centrifugare (3—4) și se supun acțiunii unui mediu hipoton și fixării (5—6). După aceea suspensia de celule (7) este picurată pe lame (8), celulele și nucleii se sparg, iar cromozomii se împrăstie pe lame (sînt etalați). După colorare (9) lamele sînt examinate la microscop (9), se fotografiază mitozele reușite (10) și, după decuparea cromozomilor din fotografii (11), se aranjează cariotipul. În acest fel se

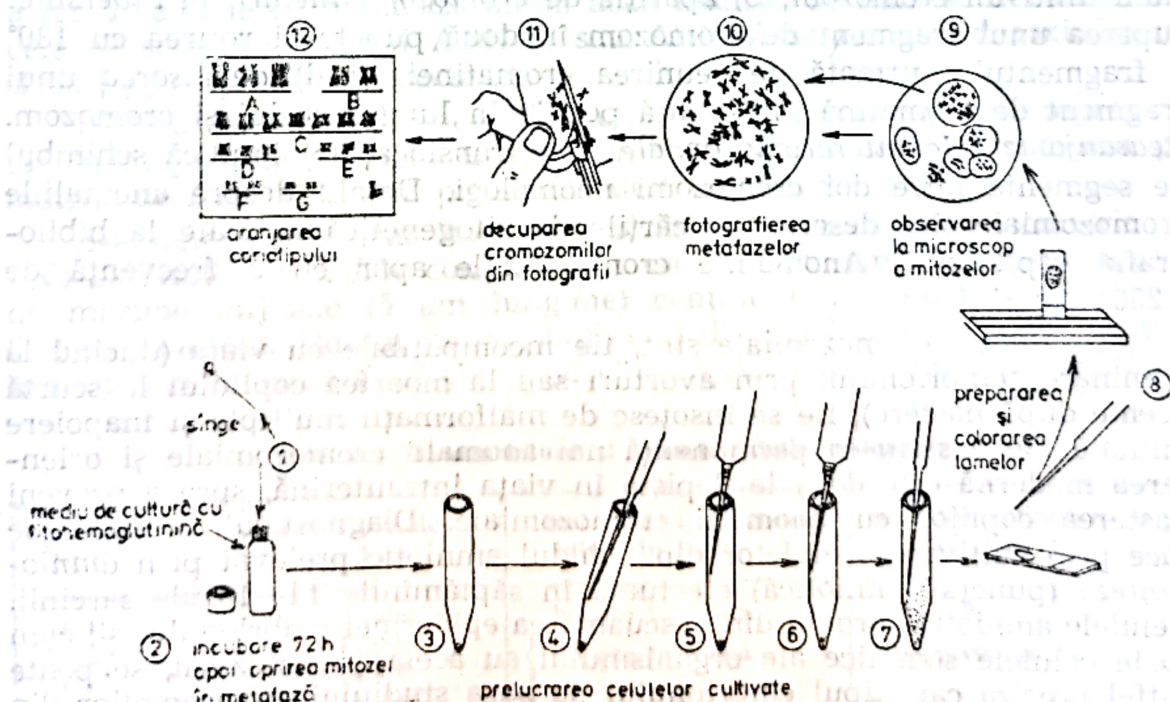


Fig. 8.4. Determinarea cariotipului (descrierea în text).

pot identifica grupele de cromozomi, dar nu este posibilă precizarea cu certitudine a fiecărei perechi. Aceasta se poate face prin *tehnicile de bandare*, tehnici speciale care permit punerea în evidență a unor benzi transversale în lungul cromozomilor și care sînt caracteristice pentru fiecare cromozom. Tehnicile de bandare au revoluționat citogenetica, deoarece permit identificarea precisă a anomaliilor structurale fine.

Există mai multe feluri de bandare. a) *Benzile Q* sînt benzi fluorescente evidențiate prin chinacrina muștar („quinacrin mustard“); b) *Benzile G* sînt obținute prin tratarea lamelor pe care se află cromozomii cu proteaze (pronază, tripsină) și colorare cu metoda Giemsa. Benzile colorate intens (apar întunecate pe fotografie) corespund benzilor fluorescente Q. c) *Benzile R* („reverse bands“) au dispoziție inversă benzilor G, adică benzile intens colorate R corespund benzilor G palide.

Pînă în prezent au fost identificate circa 2.000 gene pe cromozomii umani, iar indicarea lor pe cromozomi poartă numele de *hartă cromozomială*. Fiecare cromozom poartă un număr specific de gene, cu funcții bine stabilite. Este deci ușor de înțeles că orice anomalie cromozomială are consecințe mai mult sau mai puțin grave. Studiul anomaliilor cromozomiale este foarte important în practica citogenetică. Aici menționăm doar că *anomaliile cromozomiale* sînt de două tipuri: *anomalii numerice* (se referă la numărul cromozomilor) și *structurale* (se referă la ordinea și numărul genelor). Pot exista cromozomi în plus ori în minus față de numărul 46. De exemplu prezența unui cromozom suplimentar 21, așa-numita trizomie 21, produce idiotia mongoloidă (boala Down). Dintre anomaliile structurale cităm: *rupturile cromozomiale* și *rearanjamentele cromozomiale*. Acestea din urmă pot fi: rearanjamente *intracromozomiale* și *intercromozomiale*. Rearanjamentele *intracromozomiale* interesează un singur cromozom și cuprind: a) *delețiile*: lipsa unor porțiuni dintr-un cromozom; b) *aparitia de cromozomi inelari*; c) *inversiile*: ruperea unui fragment de cromozom în două puncte și rotirea cu 180° a fragmentului urmată de reunirea cromatinei, și d) *deplasarea* unui fragment de cromatină într-o altă poziție în lungul aceluiași cromozom. *Rearanjamentele intercromozomiale* (sau *translocațiile*) implică schimbul de segmente între doi cromozomi neomologi. Detalii despre anomaliile cromozomiale sînt descrise în cărțile de citogenetică indicate la bibliografia capitolului. Anomaliile cromozomiale apar cu o frecvență de 1/250 nașteri.

Anomaliile cromozomiale sînt, fie incompatibile cu viața (ducînd la eliminarea embrionului prin avorturi sau la moartea copilului la scurtă vreme după naștere), fie se însoțesc de malformații multiple și înapoiere mentală. Se descriu în permanență noi anomalii cromozomiale și orientarea modernă este de a le depista în viața intrauterină, spre a preveni nașterea copiilor cu anomalii cromozomiale. Diagnosticul prenatal se face prin cultivarea celulelor din lichidul amniotic prelevat prin *amniocenteză* (puncția amniotică) efectuată în săptămînile 14—16 ale sarcinii. Celulele amniotice provin din descuamarea epidermei embrionului și, cum toate celulele somatice ale organismului au aceeași cromozomi, se poate astfel preciza cariotipul embrionului pe baza studiului cromozomilor din celulele amniotice.

8.2.3. COMPOZIȚIA CHIMICĂ, ULTRASTRUCTURA ȘI ORGANIZAREA MOLECULARĂ A CROMOZOMILOR EUCARIOTICI (BIOLOGIA MOLECULARĂ A CROMATINEI)

Cromozomii sînt alcătuiți din ADN, proteine (histone și proteine ne-histonice) și puțin ARN.

Histonele sînt o clasă de proteine cu greutate moleculară mică (10.000—20.000), cu caracter bazic (sarcini pozitive). La toate eucariotele histonele se împart în cinci clase. Nomenclatura și caracteristicile sînt date în tabelul nr. 8.1. De remarcat constanța secvenței H3 și H4, indicație a rolului lor fundamental în structura cromatinei la toate speciile.

Se observă că histonele din clasa H1 se deosebesc de cele din clasele H2A, H2B, H3 și H4 prin faptul că secvența aminoacizilor la diferite specii este variabilă. De fapt cele patru clase de histone H2A, H2B, H3 și H4 sînt printre proteinele cele mai conservate din punctul de vedere al secvenței dintre toate proteinele cunoscute. De exemplu, între mazăre și bovine există doar două diferențe în secvența aminoacizilor în histona H4. Această constanță a secvenței sugerează importanța crucială pe care o au toți aminoacizii din histonele celor patru clase amintite. Relația între structură și funcție în moleculele de histone reiese din rolul histonelor în organizarea moleculară a cromatinei.

Pe lângă histone în structura cromatinei se mai întîlnesc și *proteine cromozomiale nehistonice*. Termenul este destul de imprecis, fiindcă sub acest nume se cuprind foarte multe tipuri diferite de proteine, așa cum s-a spus și la matricea nucleară, de la proteine ce intră într-adevăr în structura cromozomilor sau care se leagă de ADN intervenind în exprimarea genelor, pînă la enzime de sinteză a ADN și ARN sau de scindare a lor. Enzimele ce scindează ambii acizi nucleici se numesc nucleaze, iar cele ce scindează numai ADN-ul sau ARN-ul se numesc dezoxiribonucleaze, și, respectiv ribonucleaze.

ARN-ul este o componentă minoră a cromozomilor și este reprezentat în majoritate de ARN-ul „nascent”, adică cel care se formează pe matricea de ADN în cursul procesului de transcriere.

S-a determinat prin metode citochimice (microspectrofotometrie în UV) cantitatea de ADN conținută în cromozomii umani. Un cromozom de mărime mijlocie (5 μ m lungime) conține o moleculă de ADN de 6×10^{10} daltoni. Dublul helix (duplexul) de ADN corespunzător acestei mase are o lungime de 3 cm. Este clar că ADN-ul trebuie să fie împăn-

Tabel 8.1. Nomenclatura și caracteristicile histonelor

Nomenclatura	Greutate moleculară	Caracteristici ale compoziției în aminoacizi	Secvența aminoacizilor la diferite specii
H 1	21.000	bogate în lizină	variabilă
H 2A	14.000	{ bogate în lizină bogate în arginină	relativ constantă
H 2B	14.500		
H 3	15.000		foarte constantă
H 4	11.000		

chetat foarte compact în cromozomi pentru ca un „fir” lung de 3 cm să „încapă” în $5\ \mu\text{m}$ ($0,0005\ \text{cm}$).

Aspectul electronmicroscopic al cromozomului metafazic este o indicație a acestei împachetări strânse, cromozomii apărând ca niște ghe-me din fibre de cromatină înfășurate foarte neregulat. De fapt, fie-care cromatidă conține o singură moleculă de ADN și tot fiecare cro-matidă este formată dintr-o singură fibră de cromatină încolăcită, împa-chetată compact. La microscopul electronic se observă că în majoritatea porțiunilor fibra de cromatină este groasă de circa $30\ \text{nm}$ diametru, dar pe alte porțiuni există și zone mai subțiri. Acestea corespund unor de-talii de organizare moleculară a cromatinei.

În ultimii ani s-au înregistrat progrese însemnate. Astfel, s-a sta-bilit că există o unitate de bază, care prin repetare formează structura filamentului de cromatină. Această unitate fundamentală de organizare moleculară a cromatinei este numită *nucleozom*. Structura lui a fost precizată prin studii cu raze X și neutroni (dispersie și difracție), mi-croscopie electronică, combinate cu studii biochimice de digestie cu nu-cleaze, disociere a componentelor în soluții alcaline și analiza produșilor prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă (fig. 8.5.).

Nucleozomul constă dintr-un complex de ADN și histone. Este vorba de o anumită lungime din molecula de ADN, corespunzând la circa 200 perechi de baze, înfășurată în spirală în jurul unui octamer de histone.

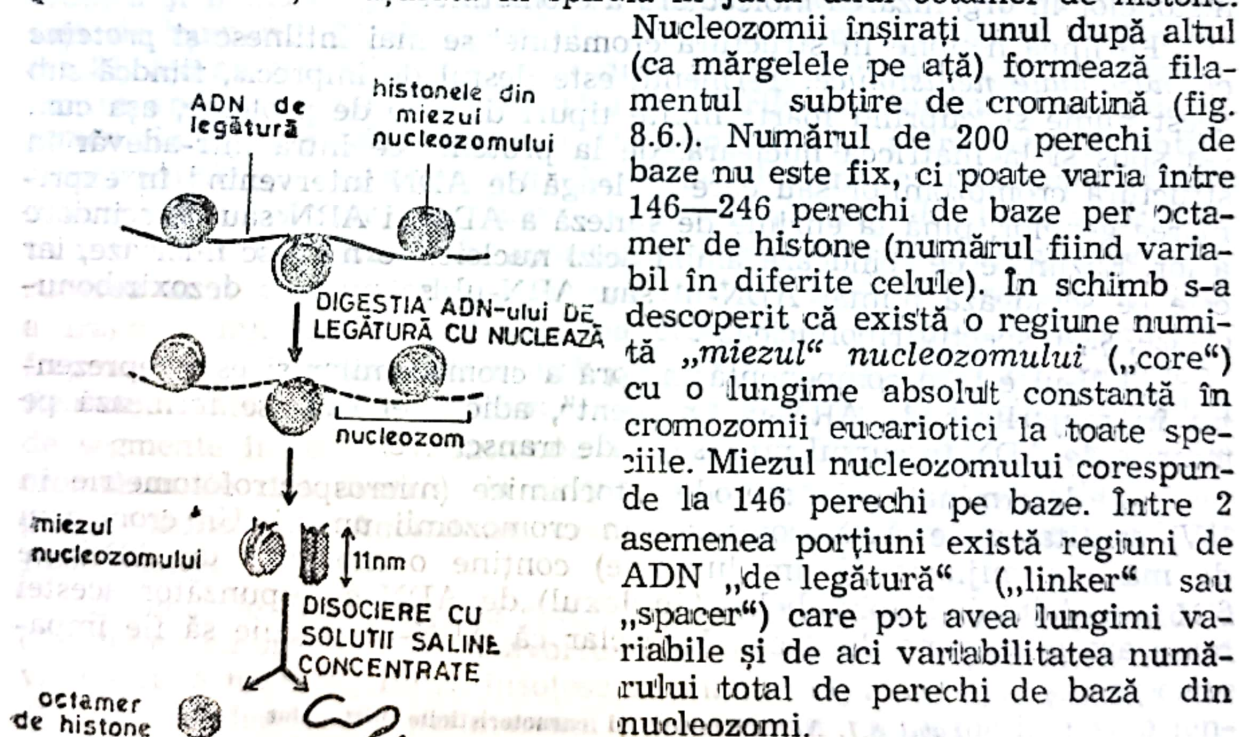


Fig. 8.5. „Disecția” filamentului subțire de cromatină.

Nucleozomii înșirați unul după altul (ca mărgelele pe ață) formează fila-mentul subțire de cromatină (fig. 8.6.). Numărul de 200 perechi de baze nu este fix, ci poate varia între 146—246 perechi de baze per octa-mer de histone (numărul fiind varia-bil în diferite celule). În schimb s-a descoperit că există o regiune numi-tă „miezul” nucleozomului („core”) cu o lungime absolut constantă în cromozomii eucariotici la toate spe-ciile. Miezul nucleozomului corespun-de la 146 perechi pe baze. Între 2 asemenea porțiuni există regiuni de ADN „de legătură” („linker” sau „spacer”) care pot avea lungimi va-riabile și de aci variabilitatea numă-rului total de perechi de bază din nucleozomi.

În miezul nucleozomului duple-xul de ADN este înfășurat în două spire în jurul octamerului de histo-ne. Octamerul de histone este un complex globular format din câte două molecule din fiecare din histo-nele H2A, H2B, H3 și H4. Există deci două exemplare din histone bogate

în lizină (H2A și H2B) și din cele bogate în arginină, (H3 și H4). Se pare că histonele bogate în arginină (H3 și H4) sînt cele care determină înfășurarea duplexului de ADN și formarea nucleozomului. Avînd un asemenea rol fundamental, este explicabilă constanța secvenței de aminoacizi în aceste histone la toate eucariotele. Miezul nucleozomului astfel format este o structură cilindrică turtită, cu diametrul de 11 nm și înălțimea de 5 nm. Completarea structurii cu regiunile „de legătură” din ADN (și cu histona H1 la unele celule) duce la structura completă a nucleozomului, de formă discoidală. Înșiruirea nucleozomilor unul după altul ca mărgelele pe o ață formează *filamentul subțire de cromatină* (cu diametrul de 11 nm).

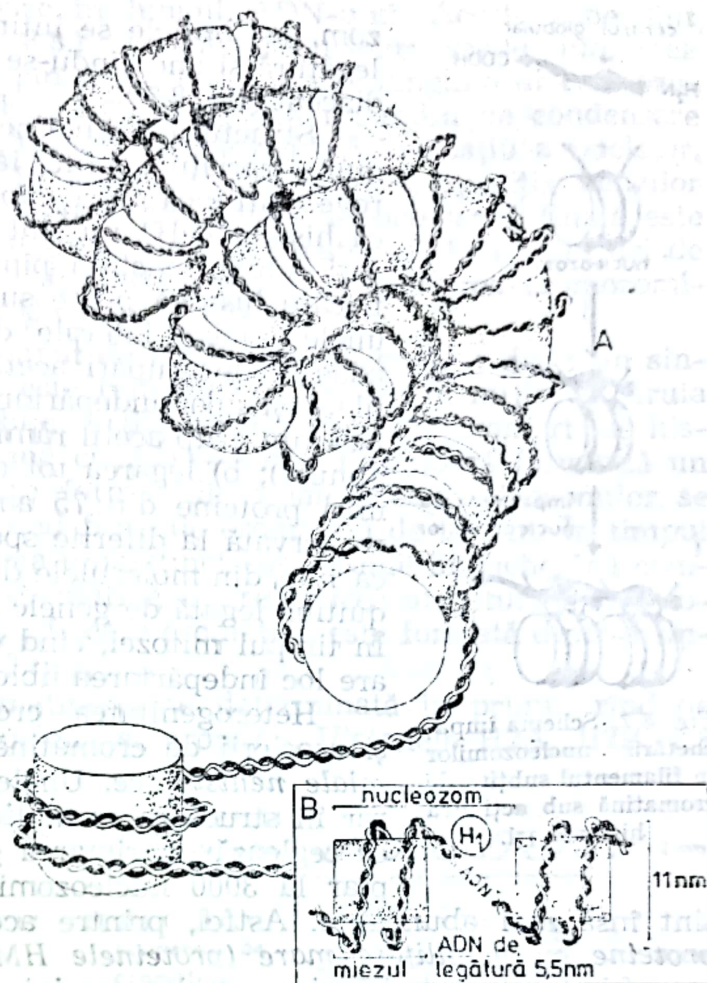


Fig. 8.6. Schema structurii nucleozomului (B) și a fibrei de cromatină de 30 nm (A).

Această structură se poate observa la microscopul electronic dacă cromatina este „întinsă” în mod artificial. În celula vie însă, cromatina probabil că adoptă rar această structură. Forma de bază sub care se poate vedea cromatina la microscopul electronic este *fibra de cromatină de 30 nm* diametru. Nu se cunoaște precis modul în care nucleozomii se împachetează în fibra de cromatină. Este chiar posibil ca în diferite regiuni ale cromozomului să existe diferite tipuri de împachetare. Un model este redat în fig. 8.6., în care fibra groasă de cromatină este redată ca o structură elicoidală (ca un solenoid sau bobină), realizată prin răsucirea în spirală a filamentului de cromatină. Această structură ar avea pasul elicei de 11 nm (cît corespunde nucleozomilor în contact prin fețele lor laterale) și diametrul de circa 30 nm, avînd în centru, în tot lungul fibrei, un spațiu gol cu diametrul de 11 nm.

Împachetarea nucleozomilor în fibra de cromatină de 30 nm este dependentă de ionul de Mg^{2+} și de histonele H1. Fiecare moleculă de histonă H1 are o regiune centrală globulară și două „brațe” ce corespund capetelor amino-terminal și carboxil-terminal din lanțul polipeptidic. Regiunea globulară se leagă de un loc anumit de pe fiecare nucleo-

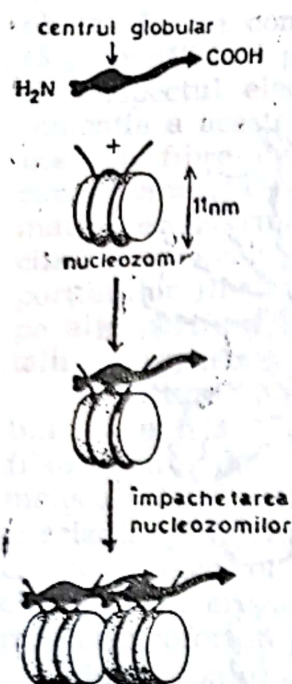


Fig. 8.7. Schema împachetării nucleozomilor în filamentul subțire de cromatină sub acțiunea histonei H1.

zom, iar brațele se întind trecând peste ADN-ul de legătură și ancorându-se de miezul nucleozomului adiacent (fig. 8.7.).

Structura cromatinei eucariotelor mai are încă multe variații subtile, iar semnificația acestei heterogenități încă nu se cunoaște complet. Astfel, se știe că histonele H1 nu sînt identice nici măcar în aceeași celulă, existînd pînă la 5 tipuri diferite. Apoi, fiecare histonă poate suferi modificări covalente în unele resturi laterale de aminoacizi cum sînt: a) adaosul de grupări acetil pe lizină prin histon-acetilază și apoi îndepărtarea lor prin histon-deacetilază (un grup acetil rămîne pe o histonă în medie 10 minute); b) legarea tot de lizină, pe histonele H2, a unei proteine din 75 aminoacizi cu secvență foarte conservată la diferite specii, numită *ubiquitină*. Circa 10% din moleculele de histone H2 au această ubiquitină legată de genele care sînt active în interfază. În timpul mitozei, cînd cromozomul se condensează, are loc îndepărtarea ubiquitinei.

Heterogenitatea cromatinei se mai datorește și asocierii de cromatină a unor *proteine cromozomiale nehistonice*. Unele dintre acestea apar foarte rar în structura cromatinei, de pildă unele proteine ce reglează exprimarea genelor apar într-un exemplar la 3000 nucleozomi. Alte proteine nehistonice sînt însă mai abundente. Astfel, printre acestea se include *grupul de proteine cu mobilitate mare* (proteinele HMG, „high-mobility group“), care fiind relativ mici și cu multe sarcini electrice migrează rapid în cursul electroforezei. Din acest grup proteinele HMG 14 și HMG 17 se găsesc în toate celulele de mamifere și, ca și acetilarea histonelor și legarea ubiquitinei de histonele H2, se leagă ambele de nucleozomii asociați cu genele active.

Există apoi și regiuni în cromatină în care ADN-ul nu este organizat în nucleozomi (acest ADN „liber“ poate fi digerat cu cantități foarte mici de dezoxiribonuclează, care nu atacă ADN-ul legat cu histonele în nucleozom). Aceste zone „hipersensibile“ la digestie apar la intervale de cîteva mii de perechi de baze din secvența ADN, ca niște „semne de punctuație“ care întrerup structura regulată a cromatinei. În aceste zone se află legate de ADN proteine cromozomiale nehistonice speciale. Un model ce redă această situație (și care în același timp este și un model de împachetare a nucleozomilor în fibra de cromatină de 30 nm) este redat în fig. 8.8.

Împachetarea duplexului de ADN în nucleozom și a acestora în fibra de cromatină de 30 nm reduce lungimea firului pe care trebuie să-l împachetăm într-un cromozom uman de la 3 cm la circa 1 mm. Este clar deci că trebuie să existe și împachetări de ordin superior ale fibrei de cromatină de 30 nm. Deși acestea nu se cunosc precis, este admisă ca foarte probabilă ipoteza că fiecare fibră de cromatină de 30 nm formează bucle de mărimi variabile prin legarea zonei aflate la o distanță de

20.000—80.000 perechi de baze în lungul ADN-ului. Aceste zone sînt prinse ca într-o clemă (fig. 8.8.). Formarea buclor scade lungimea „firului” de la 1 mm la 100 μm . Pînă la cei 5 μm lungime ai cromozomului din metafază mai trebuie să existe încă un ordin de condensare a cromatinei, probabil prin împachetarea elicoidală în spațiu a buclor, astfel încît aglomerarea lor în anumite zone duce la apariția benzilor vizibile în cromozomul din metafază (fig. 8.9.). Împachetarea finală este însoțită de fosforilarea tuturor moleculelor de histone H1 la 5 resturi de serină. Probabil că această fosforilare produce condensarea cromozomilor în cursul mitozei (Alberts și colab., 1983).

În concluzie, fiecare filament de cromatină nu conține decît un singur duplex de ADN. Acesta este înfășurat ca un arc în mijlocul căruia se află una peste alta niște bile turtite reprezentate de octamerii de histone. Fiecare octamer împreună cu ADN-ul ce-l înconjoară formează un nucleozom. Filamentul subțire format din înlănțuirea nucleozomilor se înfășoară și el în spațiu formînd fibre de cromatină de 30 nm. În timpul diviziunii celulare, condensarea cromatinei corespunde împachetării compacte în spațiu a fibrei de cromatină cu realizarea structurii cromozomului din metafază. În acesta, fiecare cromatidă este formată dintr-o singură fibră de cromatină de 30 nm.

Structura stabilă a cromatinei este determinată în primul rînd de interacțiunile dintre acizi nucleici și proteine. Histonele H2A, H2B, H3

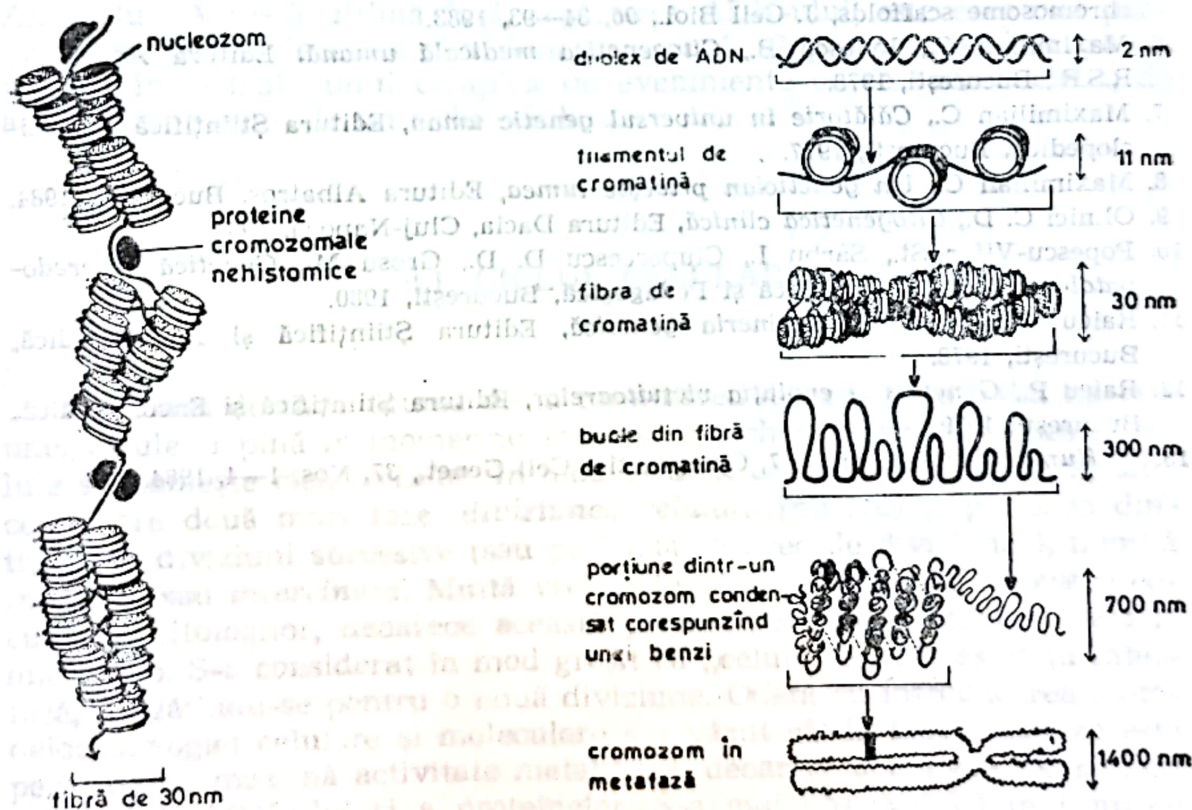


Fig. 8.8. Schema intreruperii fibrei de cromatină de 30 nm prin regiuni de ADN fără nucleozomi.

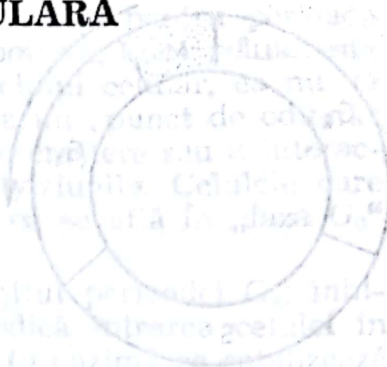
Fig. 8.9. Schema structurii cromozomilor eucariotici indicînd multiplele nivele de împachetare a cromatinei.

și H4 avînd multe resturi bazice de aminoacizi (arginină, lizină), deci cu sarcini pozitive, interacționează electrostatic cu acizii nucleici care au sarcini negative. Histona H1 influențează înfășurarea filamentului de cromatină în fibra groasă. În ceea ce privește proteinele nehistonice din cromatină, se pare că acestea controlează procesul de transcriere.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Hnilica L. S., *Chromosomal Nonhistone Proteins*, Vol. I, Biology, C R C Press, Boca Raton, 1983.
2. Sharma A. K., Sharma A., *Chromosome Techniques. Theory and Practice*, 3rd Ed., Butterworths, London, 1980.
3. Emery A. E. H., Rimoin D. L., *Principles and Practice of Medical Genetics*, vol. 1 și 2, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1983.
4. Covic M., *Biologie și genetică medicală*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1981.
5. Earnshaw W. L., Laemmli U. K., Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds, *J. Cell Biol.*, 96, 84—93, 1983.
6. Maximilian C., Ionescu B., *Citogenetica medicală umană*. Editura Academiei R.S.R., București, 1978.
7. Maximilian C., *Călătorie în universul genetic uman*, Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1977.
8. Maximilian C., *Un genetician privește lumea*, Editura Albatros, București, 1984.
9. Olinici C. D., *Citogenetică clinică*, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1983.
10. Popescu-Vifor St., Sârbu I., Ciupercescu D. D., Grosu M., *Genetică și ereditologie*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1980.
11. Raicu P., *Genele și ingineria genetică*, Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1978.
12. Raicu P., *Genetica și evoluția viețuitoarelor*, Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1979.
13. *** *Human Gene Mapping 7*, *Cytogenetics Cell Genet.*, 37, Nos. 1—4, 1984.

9. REPRODUCEREA CELULARĂ



Una dintre caracteristicile fundamentale ale materiei vii este reproducerea, care se poate întâlni și la nivelul individului și al populației, dar în ultimă analiză are la bază *reproducerea celulară*, procesul prin care dintr-o celulă rezultă două celule. Acest proces are loc în cursul diviziunii celulare, care devine posibilă numai după ce a avut loc *reproducerea biochimică* sau *moleculară*, care necesită atât materiale nutritive și energie, cât și informație genetică. În cursul reproducerii biochimice are loc dublarea masei celulei și duplicarea componentelor. Reproducerea biochimică include cel puțin patru faze: a) o fază de acumulare a substanțelor anorganice; b) sinteza enzimatică a unor substanțe organice simple (aminoacizi, monozaharide etc.); c) sinteza proteinelor; d) sinteza ADN-ului. Această ultimă fază, replicarea ADN-ului, este esențială pentru a se putea declanșa diviziunea celulară. Reproducerea celulară se petrece în cadrul unui complex de evenimente ce se succed ciclic, de aceea se vorbește de un ciclu celular.

9.1. CICLUL CELULAR

Perioada de timp scursă de la terminarea diviziunii ce a dat naștere unei celule și pînă în momentul în care se încheie diviziunea acestei celule se numește *ciclu celular*. În mod evident acest ciclu de viață al unei celule are două mari faze: *diviziunea celulară (mitoza)* și perioada dintre două diviziuni succesive (sau perioada ce precede diviziunea), numită *interfază* sau *intercineză*. Multă vreme diviziunea celulară a captat preocupările citologilor, deoarece această perioadă se putea studia direct la microscop. S-a considerat în mod greșit că „celula se odihnește” în interfază, pregătindu-se pentru o nouă diviziune. Odată cu introducerea metodelor biologiei celulare și moleculare s-a văzut că de fapt interfaza este perioada de maximă activitate metabolică, deoarece acum are loc sinteza ADN-ului, ARN-ului și a proteinelor. S-a mai observat că în timp ce sinteza ARN-ului și a proteinelor are loc în toată interfaza, sinteza ADN-ului se petrece numai într-o anumită perioadă, numită *perioada sintetică*, ce se notează cu S; înaintea ei există o *perioadă presintetică*,

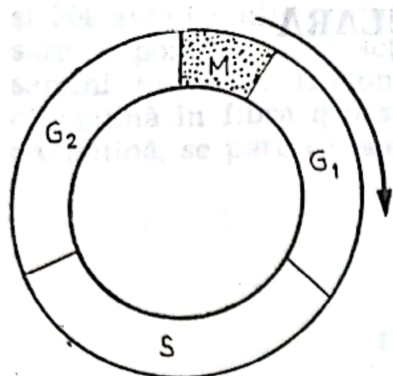


Fig. 9.7. Diagrama ciclului celular: G_1 = perioada presintetică; S = perioada sintetică; G_2 = perioada postsintetică; M = diviziunea celulară.

notată cu G_1 , iar după aceea perioada postsintetică, notată cu G_2 (fig. 9.1.).

Deci întregul ciclu celular este compus din patru perioade: G_1 (perioada de timp dintre sfârșitul mitozei și pînă la începutul sintezei ADN-ului); G_2 (perioada în care se sintetizează ADN); G_2 (perioada de timp dintre sfârșitul sintezei ADN-ului și începutul mitozei) și M (mitoză). În timpul perioadei G_1 cantitatea de ADN variază, ea se dublează în timpul perioadei S, rămîne constantă în perioada G_2 , după care se reduce la jumătate în cursul mitozei.

Durata ciclului celular este variabilă în funcție de specie și tip celular, ba chiar și de la o celulă la alta în același țesut. La eucariotele superioare ciclul celular durează 10—25 ore, din care diviziunea celulară durează 1 oră. Pentru o celulă de mamifer în cultură, la o durată a ciclului celular de circa 16 ore, durata celor patru perioade este $G_1 = 5$ ore, S = 7 ore, $G_2 = 3$ ore și M = 1 oră. Perioada G_1 are durata cea mai variabilă de la o celulă la alta, în timp ce perioada S este cea mai constantă pentru un anumit tip celular.

Există celule în organism care se divid foarte rapid, parcurgînd întregul ciclu celular în 8 ore, pe cînd altele se divid rar, deci cu ciclul celular de 100 zile sau mai mult. Ceea ce diferă este durata perioadei G_1 , în care unele celule pot petrece chiar ani de zile. Dimpotrivă, după ce au depășit perioada G_1 , timpul necesar pentru perioada S și G_2 , deci pînă la începutul diviziunii, este remarcabil de constant pentru diferite celule. De aceea s-a introdus noțiunea de *punct de restricție* (punct R) pentru momentul situat aproape de sfârșitul perioadei G_1 , care trebuie depășit pentru ca celula să poată parcurge etapele următoare ale ciclului celular. La celulele în cultură diviziunea poate fi întîrziată prin limitarea aportului de substanțe nutritive, privarea celulelor de factori de creștere, adaosul de cantități mici de inhibitori ai sintezei proteinelor. În toate cazurile ciclul celular se oprește în faza G_1 . Odată depășit punctul R, cînd celula trece în perioada S, ea parcurge restul perioadelor ciclului celular cu viteză normală, indiferent de condițiile externe.

Nu se știe precis ce determină trecerea unei celule de mamifer dincolo de punctul R. O ipoteză plauzibilă este aceea după care în celule s-ar acumula peste o anumită concentrație — prag, o proteină instabilă, numită *proteina U* (de la „unstable“), care declanșează trecerea peste punctul R și începerea sintezei ADN-ului. Fiind instabilă, proteina U poate atinge pragul de concentrație necesar numai cînd este sintetizată relativ rapid. Astfel s-ar explica prelungirea perioadei G_1 cînd este inhibată sinteza proteinelor. Existența punctului R ar putea fi privită ca o rezervă de supraviețuire a celulei. Dacă celula se află în condiții „vitrege“, ea va putea sintetiza proteine cu o viteză minimă, suficientă însă pentru a-i asigura proteinele „de întreținere“. Sinteza proteinei U va fi



redușă, celula nu se divide, dar poate rămâne viabilă pentru perioade lungi, chiar în condiții de „foame severă”. Dimpotrivă, dacă celula este privată de aport nutritiv în alte perioade ale ciclului celular, ea nu va supraviețui. Deci punctul de restricție R apare ca un „punct de odihnă” sigur pentru celulele care din cauza condițiilor de creștere sau a interacțiunilor cu alte celule trebuie să-și oprească diviziunile. Celulele care se află oprite în această stare stabilă, se spune că se află în „faza G_0 ” a ciclului celular.

Un alt punct de restricție se află spre sfârșitul perioadei G_2 ; inhibarea sintezei proteinelor în această fază împiedică intrarea celulei în mitoză. Se consideră că o proteinkinază solubilă (o enzimă ce catalizează fosforilarea proteinelor) este activată spre sfârșitul perioadei G_2 și acționează asupra proteinelor din lamina nucleară și asupra histonelor H_1 . Fosforilarea proteinelor din lamina nucleară induce dezasamblarea învelișului nuclear, pe când fosforilarea histonelor H_1 produce condensarea cromozomilor, fenomen caracteristic mitozei.

După modul în care parcurg ciclul celular se pot clasifica celulele din corpul uman în trei categorii:

— categoria I: celule care și-au pierdut capacitatea de a se divide după naștere, fiind oprite în faza G_1 : neuronii, celulele musculare;

— categoria II: celule care se divid rapid: cele din măduva osoasă hematogenă, epiderm, epiteliul mucoasei intestinale, celulele liniei germinative spermatogene;

— categoria III: celule cu o capacitate scăzută de a se divide, care însă în condiții speciale se pot divide rapid (hepatocitele, celulele glandelor endocrine). De pildă, după hepatectomie ficatul își reface rapid celulele pierdute, prin diviziunea rapidă a hepatocitelor.

În țesuturile corespunzând categoriei a II-a există două compartimente celulare: *compartimentul proliferativ*, reprezentat de celule care se divid rapid și un *compartiment neproliferativ*, reprezentat de celule care nu se divid decât în anumite condiții. Țesuturile din această categorie pierd în mod fiziologic o parte din celulele materne: de pildă celulele din epiteliul mucoasei intestinale se descuamează după 3—5 zile (cât durează migrarea lor din criptele mucoasei intestinale până la vârful vilozităților), hematiile se distrug după 120 zile de viață.

Pierderile de celule mature sînt compensate prin trecerea constantă a unor celule din compartimentul neproliferativ în cel proliferativ. Celulele din compartimentul neproliferativ sînt numite și *celule stem* (sau *celule sursă*), fiind celule de rezervă. Din punctul de vedere al ciclului celular aceste celule se află în faza G_0 , deci oprite pentru o perioadă, după care pot să reia parcurgerea ciclului celular sub acțiunea unor stimuli specifici, reprezentați de *substanțele mitogene*, adică cele care induc mitoză.

S-au descris mitogene specifice ca: eritropoietina, factorii de creștere ai unor celule (ai nervilor, ai fibroblastelor), poliamine ca putresceina sau hormoni, ca estrogenii. Există și factori tisulari, care inhibă diviziunile celulare, cum sînt chalonele (peptide sau glicoproteine).

9.2. DIVIZIUNEA CELULARĂ

Este etapă ciclului celular în care se produce distribuirea materialului genetic la cele două celule-fiice care îau naștere prin scindarea celulei-mamă. Se descriu două tipuri de diviziune celulară: *diviziunea directă* (sau *amitoza*) și *diviziunea indirectă* (care poate fi de două feluri: *mitoza* și *meioza*).

9.2.1. DIVIZIUNEA DIRECTĂ (AMITOZA)

Se caracterizează prin lipsa aparatului mitotic, este întâlnită la organisme unicelulare, fiind considerată o formă inferioară de reproducere celulară. Deși s-a descris și la organisme superioare și la om, în condiții patologice în țesuturi în regenerare și în tumori, este discutabil dacă în aceste condiții există într-adevăr o diviziune directă sau nu s-a observat fusul de diviziune.

9.2.2. DIVIZIUNEA INDIRECTĂ

Este caracterizată prin modificări sincrone citoplasmatiche și nucleare, care duc la distribuirea egală a materialului genetic la cele două celule fiice.

9.2.2.1. Mitoza

Se întâlnește la toate celulele somatice, fiind caracterizată prin faptul că celulele fiice au același număr de cromozomi ca și celula mamă (fiind celule diploide). Durata mitozei la om este de circa 60 min.

Clasic se descriu patru faze ale mitozei: profaza (30 min, sau 50% din durata totală), metafaza (8 min sau 13,4%), anafaza (4 min sau 6,6%) și telofaza (18 min sau 30%). De obicei între profază și metafază se mai descrie o fază intermediară, prometafaza.

Profaza (fig. 9.2.). Se caracterizează prin fenomene citoplasmatiche și nucleare caracteristice. În citoplasmă ca prim semn al intrării celulei



Fig. 9.2. Profaza.

în diviziune devine vizibil cel de al doilea centru celular (centrozom). Urmează apoi îndepărtarea treptată a celor doi centri celulari spre polii celulei, iar între cei doi centrosomi apar filamente dispuse sub forma unui fus (aşa-numitul fus de diviziune format din microtubuli). Fenomenele nucleare din profază constau în dispariţia nucleolului şi condensarea cromatinei nucleare, sub forma unui ghem, numit *spirem*, din care apoi apar cromozomii sub formă de bastonaşe.



Fig. 9.3. Prometafaza şi metafaza.

Prometafaza (fig. 9.3.). Este caracterizată prin dispariţia învelișului nuclear şi începerea interacţiunii cromozomilor cu fibrele fusului de diviziune. Cromozomii execută mişcări oscilatorii agitate, prin care se produce deplasarea lor spre mijlocul fusului de diviziune.

Metafaza. Cromozomii sînt aranjaţi la ecuatorul fusului de diviziune, cu axa lungă a cromozomului perpendiculară pe axa fusului. Este aşanumita *placă metafazică*, în care se produce despicarea longitudinală, a cromozomilor, prin care se despart cele două cromatide. Prin această clivare longitudinală se dublează numărul de cromozomi (deci la om din 46 cromozomi rezultă 92).

Anafaza (fig. 9.4.). Constă în deplasarea cromozomilor spre polii celulei: jumătate din numărul de cromozomi se deplasează spre un pol, iar cealaltă jumătate spre polul opus.

Telofaza (fig. 9.5.). În momentul cînd cele două grupe de cromozomi au ajuns la cei doi poli ai celulei, cromozomii aparent fuzionează în cîte un *spirem*, în jurul căruia se formează cîte o membrană nucleară. Apoi nucleul îşi recapătă structura din interfază, cromatina căpătînd aspectul de reţea şi granule, de asemenea reapare nucleolul. În final se produce despicarea citoplasmei la nivelul plăcii ecuatoriale, fenomenul fiind numit *citodiereză*.

Prin mitoză se formează două celule-fiice, fiecare avînd o cantitate de ADN egală cu celula mamă. Se descriu însă patru forme de mitoză după gradul de asemănare al celulelor-fiice cu celula mamă:

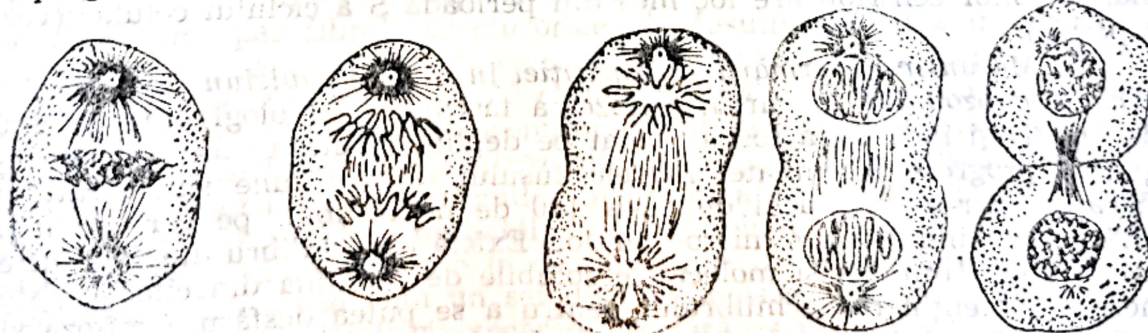


Fig. 9.4. Anafaza.

Fig. 9.5. Telofaza.



a) mitoză *homoplastică (homotipică)* sau *mitoză egală*: în aceasta cele două celule-fiice sînt asemănătoare între ele și cu celula-mamă; se întîlnește numai la celulele nediferențiate (foarte tinere);

b) *heteroplastică (heterotipică)*: cele două celule care iau naștere sînt similare între ele, dar sînt mai mature, mai diferențiate decît celula mamă; de aceea se mai numește și *mitoză de diferențiere*;

c) *homoheteroplastică (asimetrică)*: una din celulele-fiice seamănă cu celula mamă, cealaltă este diferită;

d) *mitoză de diferențiere (de întinerire)*: celula care se divide dă naștere la celule mai tinere; aceasta se întîlnește la limfocit.

Ca fază obligatorie a ciclului celular (în situația în care s-au depășit punctele de restricție) și ca o consecință a dublării masei și componentelor celulei, mitoză este declanșată de factori încă insuficient precizați. Totuși se descriu trei grupe de asemenea factori:

— generali: temperatură, lumină, hormoni (tiroidieni, hipofizari), vitamine;

— intracelulari: modificarea raportului nucleocitoplasmatic și nucleolo-nuclear (ca și cum volumul crescut al citoplasmei nu mai poate fi controlat de nucleu și este necesară diviziunea celulei);

— intercelulari: sînt probabil cei mai importanți. Cum în țesuturi există un raport bine stabilit între celulele mature în stare de funcționare, celulele uzate și cele care se divid, ori de cîte ori moare un grup de celule, printr-un mecanism de retro-acțiune („feed-back“) se declanșează diviziunea altui grup de celule, astfel ca raportul între cele trei categorii de celule să rămînă aproximativ același. Despre factorii ce determină mitozele se va mai aminti la capitolul privind proliferarea celulară.

9.2.2.2. Evenimente moleculare în cursul mitozei la nivelul centriolilor, fusului de diviziune și al plasmalemei

A. Al doilea centrozom, care devine vizibil în citoplasmă la începutul profazei, este format, ca și cel preexistent, din doi centrioli aranjați perpendicular unul pe altul. Dublarea perechii de centrioli nu se face prin diviziunea celor vechi, ci prin asamblarea unor noi centrioli din depozitul de tubuline al citoplasmei. Polimerizarea tubulinei pentru formarea noilor centrioli are loc încă din perioada S a ciclului celular (vezi cap. 5.3.).

B. *Mecanismul formării și dispariției fusului de diviziune și al deplasării cromozomilor în cursul mitozei* a fascinat pe biologi aproape 100 de ani. Deși încă nu a fost elucidat pe deplin, în ultimii ani, s-au înregistrat progrese însemnate. Fibrele fusului de diviziune sînt alcătuite fiecare dintr-un mănuchi de circa 100 de microtubuli pe care se mai află și proteine asociate microtubulilor. Există un echilibru dinamic între microtubulii din fus și moleculele solubile de tubulină din citosol. Este necesară menținerea echilibrului pentru a se putea desfășura mitoză și pentru a se putea deplasa cromozomii. Atît inhibarea depolimerizării tubulinei (prin plasarea celulelor în apă grea sau prin tratare cu taxol)

și deci stabilizarea microtubulilor, cât și blocarea polimerizării tubulinei (prin colchicină, temperatură scăzută sau presiune hidrostatică mare), ceea ce duce la dezasamblarea fusului de diviziune, au ca rezultat imposibilitatea deplasării cromozomilor și deci este oprită desfășurarea mitozei. Depolimerizarea fusului de diviziune prin administrarea de *vinblastină* sau *vincristină* stă la baza tratamentului cancerului cu aceste citostatice.

În fusul mitotic există două feluri de fibre, după modul de ancorare la capete: a) *fibrele polare*, cele mai numeroase se îndreaptă de la cei doi poli ai fusului spre ecuatorul său; b) *fibre cinetocorice*: sînt atașate la un capăt de cinetocorul fiecărei cromatide și au celălalt capăt îndreptat spre polul fusului (fig. 9.6.).

S-a considerat multă vreme că centriolii coordonează formarea fusului de diviziune. Se știe azi că de fapt centrul organizator al microtubulilor, care determină asamblarea fusului de diviziune, este materialul pericentriolar (aflat într-o zonă nebuloasă în jurul centriolului, după cum s-a spus la capitolul 5.3.). Dovada că este așa o aduc experiențele de distrugere a centriolilor prin laser sau existența la plantele superioare a unor fusuri mitotice fără centrioli (*anastrole*). În ambele cazuri fusul de diviziune funcționează normal și în absența centriolilor. Deci distribuirea centriolilor spre polii celulei în timpul diviziunii poate că a apărut doar ca să asigure segregarea corectă, câte o pereche la fiecare din cele două celule-fiice a centrozomilor, structuri importante în determinarea polarității și a mișcărilor celulei animale (Alberts și colab., 1983).

Cinetocorul este structura specializată în ancorarea cromozomului de fusul de diviziune. Cromozomul din metafază constă din cele două cromatide surori unite la nivelul centromerului. La sfîrșitul profazei, pe fiecare din cele două fețe opuse ale centromerului se dezvoltă câte un cinetocor; la microscopul electronic acesta apare ca o structură multi-stratificată, dar nu se cunoaște compoziția sa. La începutul prometafazei pe cinetocor apar fibrele cinetocorice ale fusului de diviziune, formate din mănuchiuri de microtubuli, ce radiază în direcții opuse de pe cele două regiuni cinetocorice ale fiecărui cromozom. Fibrele cinetocorice servesc la așezarea în poziție a cromozomilor, atît în placa metafazică, cît și în timpul deplasării lor spre centrozomi în anafază. Prin mișcările dezordonate oscilatorii ale cromozomilor în prometafază se ajunge la un moment dat (din întîmplare probabil) ca fibrele cinetocorice de pe o parte a cromozomului să se angajeze în spațiul dintre fibrele polare dinspre un centrozom. Este ca și cum un set de fibre polare capturează un cinetocor, după care și celălalt cinetocor se asociază cu fibrele polare ce pleacă de lîngă centrozomul opus.

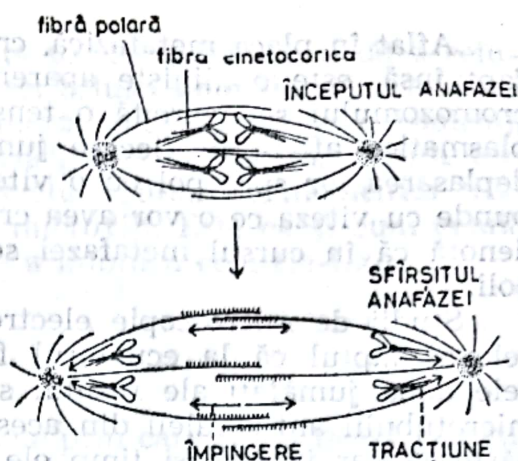


Fig. 9.6. Diagrama fibrelor fusului de diviziune și a deplasării cromozomilor. Porțiunile hașurate reprezintă polimerizarea tubulinei, în fibrele polare în (—) cursul deplasării centriolilor.

Aflat în placa metafazică, cromozomul pare să se afle în repaus. Re fapt însă, este o „liniște aparentă”, fiindcă dinspre ambii poli asupra cromozomului se exercită o tensiune. Dacă se urmăresc particule citoplasmice aflate în fiecare jumătate a fusului metafazic, se observă deplasarea lor spre pol cu o viteză de circa 1 $\mu\text{m}/\text{minut}$ (ceea ce corespunde cu viteza ce o vor avea cromozomii în anafază). Această deplasare denotă că în cursul metafazei se generează în fus forțe orientate spre poli.

Studii de microscopie electronică seriată a fusului de diviziune au relevat faptul că la ecuatorul fusului de diviziune fibrele polare din cele două jumătăți ale fusului se suprapun parțial. În timpul anafazei microtubulii antiparaleli din aceste două seturi de fibre polare se îndepărtează dar în același timp ele se alungesc prin polimerizarea tubulinei la capetele microtubulilor dinspre ecuator (fig. 9.6.). Acestea sînt capetele (+), deci acelea la care este favorizată polimerizarea tubulinei (vezi cap. 5.3.). Dimpotrivă, fibrele cinetocorice au capetele (+) blocate în cinetocor și au capetele (—) libere.

Deplasarea cromozomilor în anafază este rezultatul a două evenimente independente: a) mișcarea spre poli a fibrelor cinetocorice ce trag cu ele cromatidele atașate și b) alungirea și alunecarea unele peste altele a fibrelor polare ce împing cei doi poli îndepărtîndu-i unul de altul. Care sînt forțele ce generează mișcările? Se pare că alunecarea fibrelor polare se face prin mecanismul microtubul-dineină, deoarece inhibitorii dineinei o blochează. Deplasarea spre poli a cromatidelor se face probabil prin depolimerizarea capetelor (—) ale microtubulilor din fibrele cinetocorice aflate spre centrozomi. Pe măsură ce are loc depolimerizarea tubulinei, fibrele cinetocorice se scurtează și astfel cromozomii sînt atrași spre poli.

C. *Dezasamblarea învelișului nuclear în prometafază* se face prin fragmentarea celor două membrane, prin dezasamblarea laminei nucleare și prin dezasamblarea complexelor porilor. Se pare că rolul esențial îl joacă fosforilarea celor trei proteine din lamina nucleară, care duce la dezasamblarea întregului înveliș. Ca o consecință rezultă fragmente de membrane ce nu se pot distinge de reticulul endoplasmic, deși rămîn vizibile în jurul fusului nuclear.

Refacerea învelișului nuclear în telofază are loc în urma defosforilării proteinelor laminare, la început fragmentele de membrană îmbrăcînd incomplet fiecare cromozom, după care fragmentele fuzionează și se reface întreg învelișul. După aceea reîncepe sinteza ARN-ului și prin aceasta reapare nucleolul.

D. *Scindarea citoplasmei în cursul citodierezei (citokinezei)* începe prin apariția unui șanț pe suprafața celulei, care se poate vedea la microscopul electronic cu baleiaj. Pe fundul șanțului se pot observa cute, ceea ce denotă că membrana este trasă spre interiorul celulei. De fapt, sub plasmalemă, există un *inel contractil* format dintr-un mănuchi de filamente de actină, care începe să fie asamblat încă de la începutul anafazei. Acest inel se contractă prin mecanismul molecular actină-miozină, dar spre deosebire de celelalte mișcări ce au la baza lor acest mecanism, pe măsură ce se contractă, inelul își micșorează diametrul, prin depolimerizarea filamentelor sale.

E. Cele două celule-fiice au suprafața totală mai mare decât a celei mamă. De aceea biogeneza plasmalemei celulei animale se intensifică înaintea diviziunii. De fapt, văzută la microscopul electronic cu baleiaj, suprafața celulei devine tot mai „păroasă”, deci cu tot mai mulți *microvili*, pe măsură ce o celulă parcurge ciclul celular. În momentul citodierzei cele două celule-fiice au puțini microvili. Este ca și cum celula mamă și-a făcut o rezervă de haine spre a îmbrăca celulele-fiice.

9.2.2.3. Meioza

Meioza se întâlnește numai în procesele prin care se formează gameții (spermatozoidul și ovulul), deci în spermatogeneză și ovogeneză. Caracteristic pentru meioză este faptul că se înjumătățește numărul de cromozomi, deci plecând inițial de la celule diploide se ajunge la gameți haploizi, care conțin numai câte un cromozom din fiecare pereche de omologi și numai un cromozom de sex. Acest lucru este foarte important, fiindcă prin fuziunea ovulului cu spermatozoidul ia naștere ovocitul, deci din două celule haploide se ajunge la o celulă diploidă, din care se poate dezvolta în mod normal întregul organism. Dacă gameții ar fi celule diploide, ovocitul ar fi tetraploid și nu ar putea fi viabil. Deci meioza are o semnificație profundă (fig. 9.7.).

Înjumătățirea numărului cromozomilor înseamnă înjumătățirea materialului genetic, ceea ce se realizează prin două diviziuni indirecte ce se succed fără ca între ele să se mai producă sinteză de ADN. Deci ADN-ul replicat o singură dată (înaintea primei diviziuni) se împarte de două ori. Cele două diviziuni se numesc meioza I și meioza II, iar la mamifere meioza I este diviziunea redukțională, pe când meioza II este o mitoză homoplastică (fig. 9.8.). Astfel, din fiecare celulă diploidă care intră în meioză rezultă în final patru celule haploide.

Ceea ce distinge în mod clar meioza I de mitoze este că în anafază migrează spre poli celulei cromozomi întregi duplicați și nu jumătăți ale lor (cromatide). Prin urmare, când celula meiotică se divide, fiecare fiică primește câte un cromozom întreg (duplicat) din fiecare pereche de omologi, sau altfel spus, două copii de ADN provenind numai de la unul din cei doi omologi. Abia în meioza II cromatidele surori se despart ca în oricare mitoză.

Meioza I este un proces foarte complicat, în care fenomenele caracteristice acestui tip de diviziune indirectă se petrec în profază. De altfel *profaza I* este foarte lungă. Meioza I poate dura zile, luni și ani de zile (în funcție de specie) și profaza I ocupă 90% din aceste durate.

De pildă la om celulele germinative primordiale (gonocitele) apar în ziua a 20-a a gestației și migrează spre gonadele embrionului în săptămânile următoare. La femei ele formează *oogoniile*, fiecare fiind înconjurată de celule foliculare formând foliculul primordial. În ovare oogoniile se divid prin mitoze, până când, în luna a treia a vieții intrauterine, oogoniile devin *oocite primare*, care încep meioza I. De fapt oogonia devine oocit primar în momentul când începe meioza I. La naștere ovarul conține circa 2 milioane oocite primare care și-au început deja meioza I fiind oprite în profaza I. Ele rămân în profaza I până la pubertate;

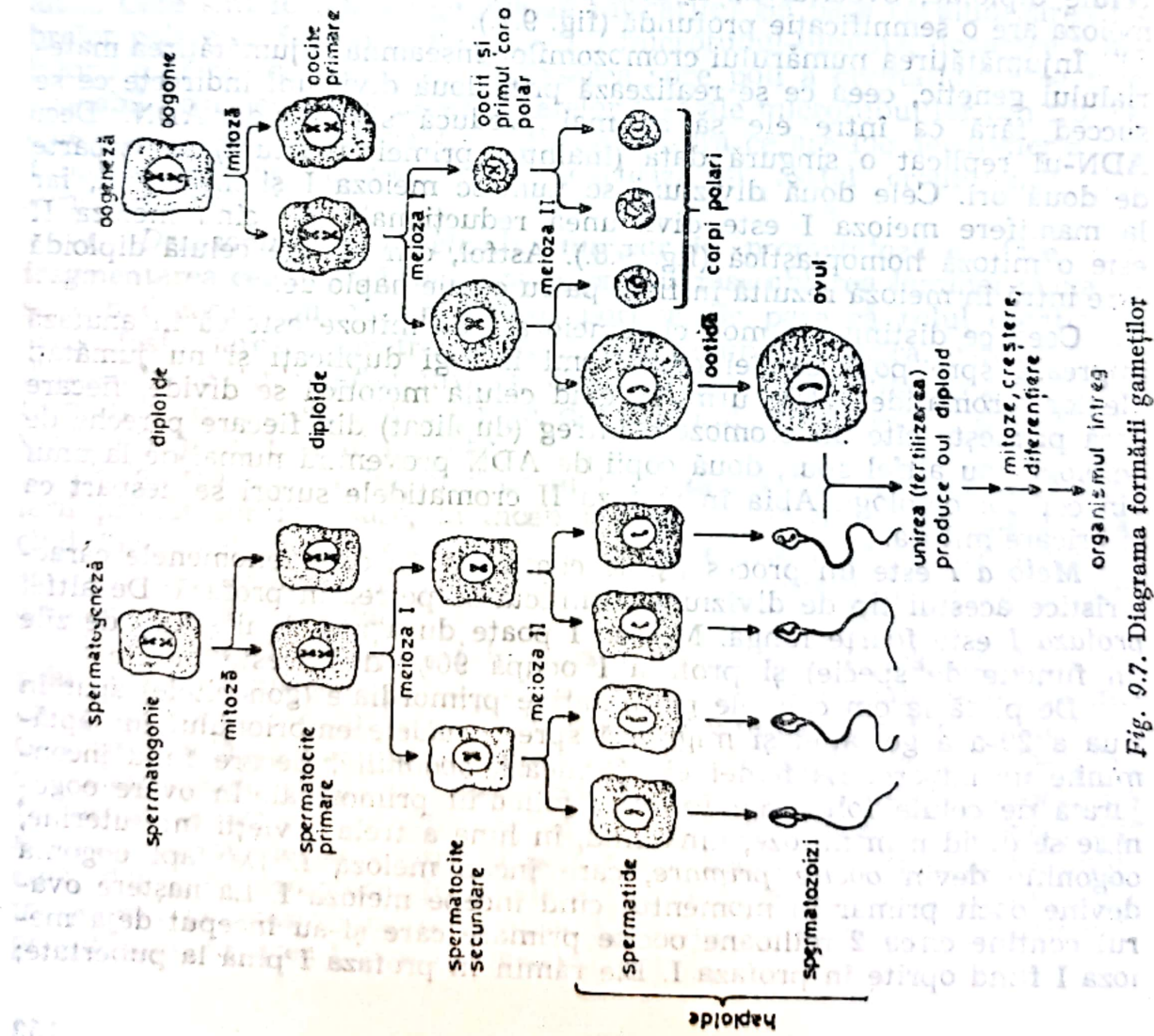


Fig. 9.7. Diagrama formării gameților

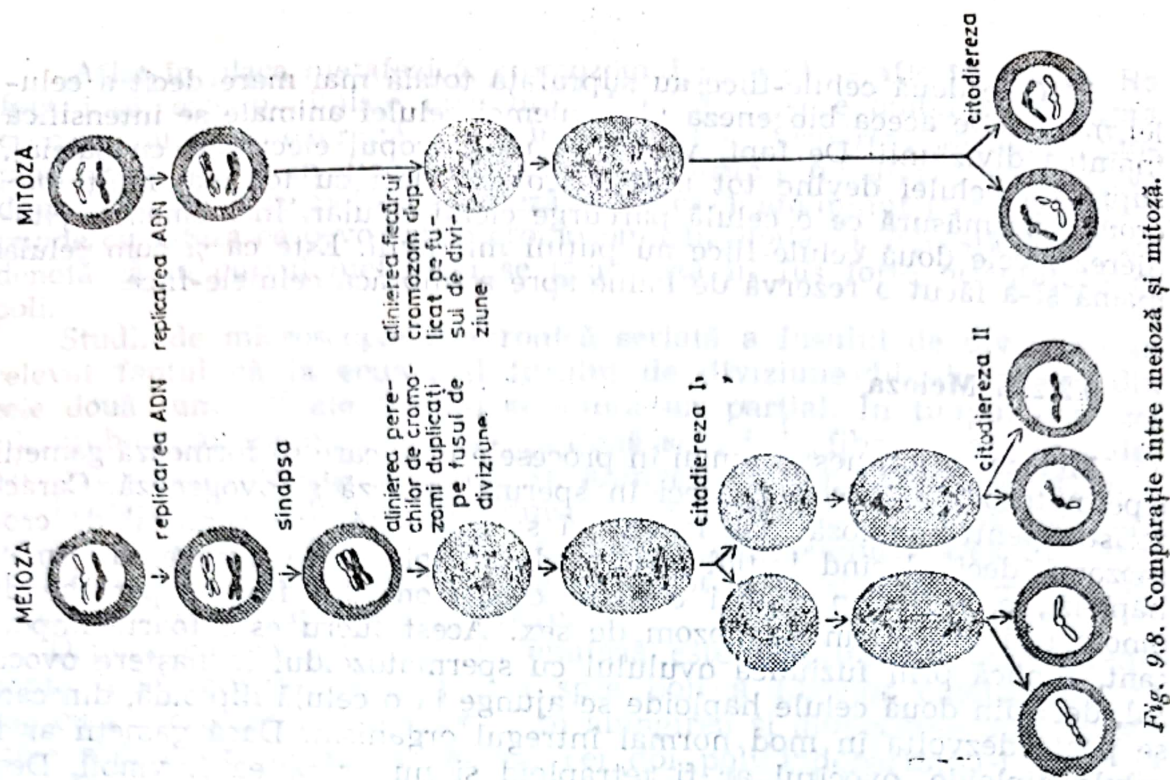


Fig. 9.8. Comparatie între meioză și mitoză.

de acum înainte, timp de circa 40 ani, cât durează viața reproductivă a femeii, în fiecare lună, sub acțiunea unei 'descărcări' de hormon de luteinizare (LH), un oocit primar își completează meioza I, formînd un corp polar și un oocit secundar. Acesta intră în meioza II numai după fertilizare (adică fuziunea sa cu spermatozoidul).

Numai circa 400—500 din oocite își completează meioza I în viața unei femei. Majoritatea oocitelor primare (99,9% din foliculii primordiali) degenerază, la pubertate rămînînd numai circa 300.000 oocite primare. Înseamnă că la femei meioza I durează între 12 și 50 de ani. De aceea în acest interval foarte lung este posibilă apariția unor aberații cromozomiale, probabilitate ce crește cu vîrsta; la mamele în vîrstă de peste 40 ani, 10% din copii au trizomie 21.

La bărbați gonocitele primare migrează în gonade în viața intra-uterină și sînt apoi încorporate în tubii seminiferi. Aceștia conțin spermatogoniile, care intră în meioză la pubertate. Un ciclu complet de spermatogeneză durează circa 24 zile, dintre care profaza I durează 13—14 zile. În contrast cu oogeneza, spermatogeneza continuă la bărbat pînă la o vîrstă avansată. În fiecare ciclu meiotic sînt formați patru spermatozoizi dintr-o spermatogonie. Transformarea spermatidelor în spermatozoizi maturi se produce printr-un proces complex numit spermiogeneză.

Profaza I este împărțită în cinci stadii (fig. 9.9.).

a. *Leptonema*: se produce condensarea cromatinei și cromozomii devin vizibili ca filamente lungi, cu diametrul neuniform, ce se atașează cu ambele capete de învelișul nuclear, la nivelul structurilor numite *plăci de atașare*. Deși cromozomii sînt duplicați și constau din două cromatide surori, acestea sînt strîns atașate, încît apar ca un cromozom unic. Acesta are o structură specială: în lungul cromozomului, pe o parte a sa, se formează o lamă proteică numită *axă*, iar cromatina este dispusă sub formă de bucle care proemină din cromozom de partea opusă axei (fig. 9.10.).

b. *Zigonema*: se caracterizează prin faptul că cromozomii omologi din setul matern și din setul patern se apropie și se alipesc (fără a fuziona), fenomen numit *conjugarea cromozomilor* sau *sinapsă*. Aceasta începe adeseori prin venirea în contact a capetelor cromozomilor omologi atașate învelișului nuclear, după care alipirea se produce ca la închiderea unui fermoar, de la ambele capete. Alteori sinapsa începe

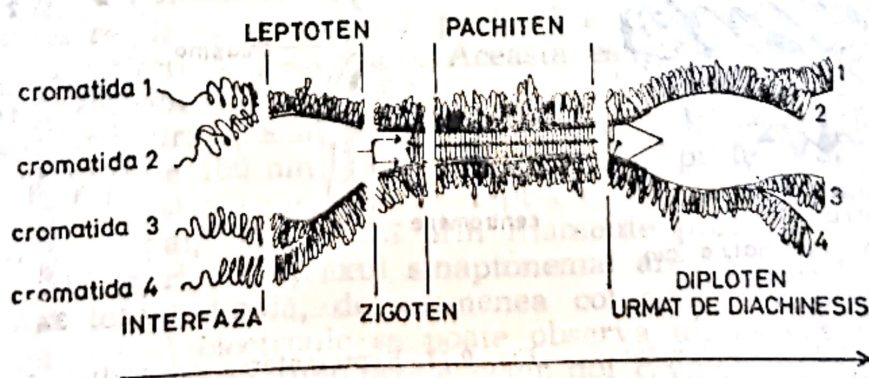


Fig. 9.9. Diagrama modificării cromozomilor în profaza I și a meiozel.

în regiunile mijlocii ale cromozomilor și se întinde spre capete. Prin conjugare se realizează alinierea perfectă a genelor din perechea de cromozomi omologi care constituie acum cromozomul bivalent, numit și *tetradă*, deoarece fiecare cromozom omolog din alcătuirea sa este compus de fapt din două cromatide (deci sînt patru cromatide în total). Cei doi cromozomi omologi sînt alăturați prin dispunerea paralelă a celor două axe în interiorul tetradei, în timp ce buclele de cromatină proemină în afara cromozomului bivalent.

c. *Pachinema*: începe în momentul în care sinapsa este completă și celula poate rămîne așa timp de mai multe zile. Caracteristic pachinemei este *fenomenul de crossing-over*: ruperea unei cromatide materne și a unei cromatide paterne în aceeași poziție în lungul cromozomului și unirea încrucișată a fragmentelor. (fig. 9.11). Deci un fragment ce a fost inițial pe un cromozom patern ajunge pe cromozomul omolog matern și invers. Acest schimb de gene între cromozomii omologi are un rol extrem de important în ereditate, deoarece gametul unui individ va avea în final gene ce provin de la ambii părinți. Aceste noi combinații de gene, care sînt transmise la generația următoare fac ca fiecare copil să fie diferit de alți frați sau surori (cu excepția gemenilor monoziگوți care sînt identici genetic) și de asemenea să moștenească însușiri, caractere genetice, de la ambii părinți și de la bunici.

d. *Diplonema*: cromozomii omologi încep să se despartă (desinapsa), rămînînd însă legați în locurile în care s-a produs crossing-over-ul, locuri numite *chiasme*. În oocite diplonema poate dura luni sau ani de zile, deoarece cromozomii se decondensează și începe sinteza de ARN.

Cele patru faze descrise mai poartă și denumirile de leptoten, zigoten, pachiten și diploten.

e. *Diachinesis*: încetează sinteza ARN-ului și cromozomii se condensează, se îngroașă și se detașează de învelișul nuclear. Acuma de-abia se observă clar că fiecare bivalent conține patru cromatide, cromatidele

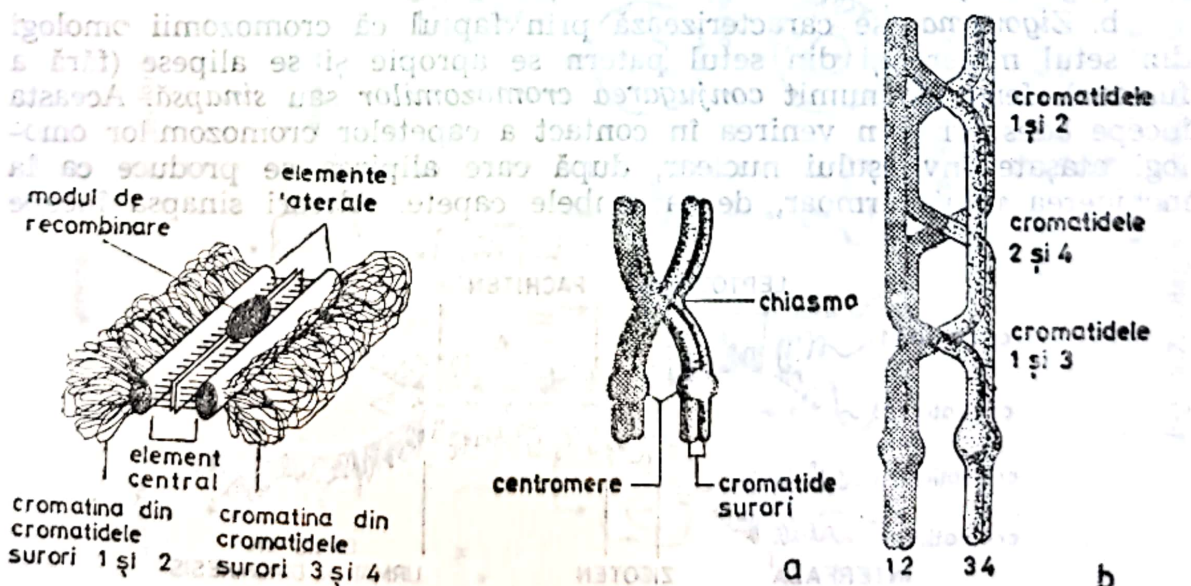


Fig. 9.10. Structura complexului sinaptonemal din cromozomul bivalent.

Fig. 9.11. Reprezentarea schematică a tetradei cu producerea unui singur crossing-over (a) și a trei fenomene de crossing-over (b).

surori fiind unite la nivelul centromerilor, pe cînd cromatidele nesurori, între care s-a produs crossing-over-ul, sînt unite la nivelul chiasmelor.

În esență fenomenele importante și caracteristice profazei I sînt: condensarea cromozomilor, conjugarea sau sinapsa și crossing-over-ul (schimbul de gene între cromatide nesurori).

Prometafaza I se caracterizează prin dispariția învelișului nuclear și formarea fusului de diviziune. În *metafaza I* cromozomii se atașează de fibrele fusului de diviziune și se formează placa metafazică (sau ecuatorială).

Anafaza I constă în deplasarea cîte unui cromozom întreg (avînd două cromatide surori) din fiecare cromozom bivalent către un pol al celulei, pe cînd celălalt cromozom se deplasează spre polul opus. Deci spre deosebire de mitoză nu se despart cromatidele surori, ci ele rămîn legate la nivelul centromerului.

Telofaza I: se caracterizează prin reasamblarea nucleilor și citodiereză.

După meioza I urmează o scurtă interfază, fără sinteză de ADN, după care se succede *meioza II*. Abia acum se despart cromatidele surori la nivelul centromerului și are loc deplasarea lor spre polii celulei. Meioza II constă din cele patru faze ale diviziunii indirecte, fără diferențe față de o mitoză obișnuită.

9.2.2.4. Evenimente moleculare în meioză

Primele observații citologice care au dovedit că gameții sînt celule haploide au fost făcute în 1883 pe un vierme (*Parascaris equorum*), la care s-a constatat că nucleii gameților au numai doi cromozomi, pe cînd oul fertilizat are patru cromozomi. S-a înțeles atunci că este necesară o formă specială de diviziune prin care să se formeze gameții haploizi. Aceste observații au fost și printre primele care au sugerat că cromozomii poartă informația genetică, iar teoria cromozomială a eredității de mai tîrziu a putut explica paradoxul aparent al contribuției materne și paterne la caracterele urmașului, în ciuda diferenței mari dintre volumul oocitului și al spermatozoidului. Abia după 1930, prin cercetări combinate de citologie și genetică s-au descoperit cîteva trăsături importante ale meiozei, și numai în zilele noastre a început elucidarea lor la nivel molecular.

A. *Sinapsa* realizează o aliniere perfectă a genelor (necesară pentru a se putea realiza crossing-over-ul). Aceasta este posibilă datorită faptului că între cei doi cromozomi omologi din bivalent (sau tetradă) se organizează o structură specială numită *complex sinaptonemal* (fig. 9.10.), care umple spațiul de 100 nm dintre cele două axe proteice ale cromozomului bivalent. Acesta constituie de fapt elementele laterale ale complexului sinaptonemal, fiind unite prin filamente proteice transversale, ca treptele unei scări. Complexul sinaptonemal are în centrul său și o lamă centrală longitudinală, de asemenea compusă din proteine. De aceea la microscopul electronic se poate observa un aspect trilaminar, cele două lame periferice fiind axele celor doi cromozomi omologi, iar lama centrală (mai subțire) corespunde elementului central din complex.

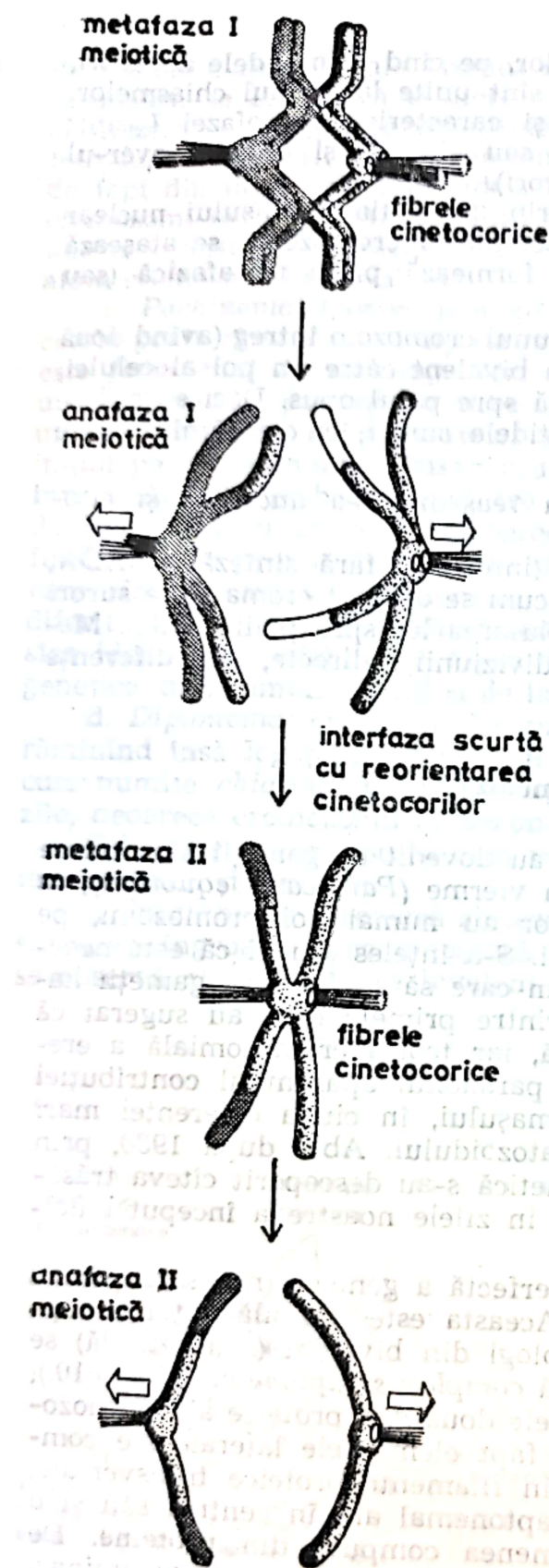


Fig. 9.12. Comparație între mecanismele alinierii și segregării cromozomilor în meioza I și meioza II.

Lateral, de o parte și de alta, se pot vedea buclele de cromatină ale celor doi cromozomi bivalenți, în care nu se pot deosebi cromatidele surori. Se consideră că axele celor doi cromozomi omologi asigură specificitatea aranjării lor în perechi.

B. *Crossing-over-ul* înseamnă recombinația genetică între două cromatide nesurori din tetradă. Aceasta este mediată de structuri proteice sferice sau elipsoidale, cu diametrul de circa 90 nm, numite *noduli de recombinație* (fig. 9.10). La fiecare chiasmă se află câte un asemenea nodul, care se presupune că are în alcătuirea sa toate elementele enzimatice necesare pentru a tăia cromatina din cromatidele maternelne și paternne și a o suda încrucișat, peste spațiul de circa 100 nm ce separă cromatidele în cromozomul bivalent.

C. *Chiasmele* pot apărea între oricare cromatide nesurori din tetradă (fig. 9.11). De obicei pe fiecare pereche de cromozomi omologi apar la om două sau trei chiasme. Deși chiasmele apar în pachinemă, ele nu devin vizibile decât în diplonemă, când începe îndepărtarea cromozomilor omologi. Chiasmele au și rolul de a menține uniți cei doi cromozomi omologi până în momentul anafazei, când ei se vor despărți definitiv, spre a migra unul la un pol și celălalt la polul opus al celulei. Deci, chiasmele îndeplinesc și rolul pe care în mitoză îl au centromerii cromozomilor.

D. *Segregarea sau separarea cromozomilor* în meioză este diferită de cea din mitoză. În meioză fibrele cinetocorice de pe cromatidele surori ale fiecărui cromozom omolog din bivalent privesc spre același pol (fig. 9.12.). În timp ce în mitoză segregarea cromozomilor înseamnă separarea cromatidelor surori și deplasarea lor spre cei doi poli prin fibrele cinetocorice care privesc spre

polii opuși, în meioză segregarea cromozomilor înseamnă separarea cromozomilor întregi la nivelul chiasmelor.

În perioada scurtă a interfazei dintre meioza I și meioza II are loc reorientarea cinetocorilor din fiecare cromozom omolog, astfel că în metafaza II fibrele cinetocorice privesc spre polii opuși. În anafaza II se produce deplasarea cromatidelor surori spre centrozomi, ca în orice mitoză.

E. Fiecare gamet din cei patru ce rezultă dintr-o celulă intrată în meioză are un set unic de gene, diferit de al celorlalți trei gamete. Aceasta se datorează recombinării genetice care se produce în cursul crossing-over-ului. De aceea fiecare individ este *unicat genetic*.

F. Până acum s-a descris numai conjugarea cromozomilor omologi. Dar cromozomii de sex nu sînt omologi, ori în meioză trebuie și ei să sufere conjugarea. Într-adevăr, se produce și o conjugare a cromozomilor de sex. La femei se produce, în meioza din oogeneză, sinapsa și apoi segregarea celor doi cromozomi X, analog cu a cromozomilor omologi. La bărbați se produce, în cursul spermatogenezei, o conjugare și apoi o segregare a cromozomului X cu cromozomul Y, datorită unei mici regiuni de omologie a celor doi cromozomi. După meioză rezultă două feluri de spermatozoizi: unii conțin cîte un cromozom Y și vor da embrioni de sex masculin, alții cîte un cromozom X și după fuziune cu ovulul rezultă embrioni de sex feminin.

Accidentele meiozei duc la multe tipuri de anomalii cromozomiale.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Bareliuc, L., Neagu, N., *Embriologie umană*, Editura Medicală, București, 1977.
2. Berlin R. D., Oliver J. M., Surface functions during mitosis. II. Quantitation of pinocytosis and kinetic characterization of the mitotic cycle with a new fluorescence technique, *J. Cell Biol.*, 85, 660—671, 1980.
3. Golumbovskaya I. N., Genetic Control of Meiosis, *Int. Rev. Cytol.*, 58, 247—249, 1979.
4. Kihira N., Izutsu K., Role of the cell membrane in mitosis: Effects on HeLa cell division of ouabain, amphotericin B, nucleotides, *Cell Struct. Function*, 4, 251—255, 1979.
5. Pawlets N., Little M., Cell division and solutions, *Interdisc. Science Rev.*, 5, 138—148, 1980.
6. Silver R. B., Cole R. D., Isolation of mitotic apparatus containing vesicles with calcium sequestration activity, *Cell*, 19, 505—516, 1980.

10. REPLICAREA ȘI BIOSINTEZA ADN. IMPLICAȚII ȘI APLICAȚII MEDICALE: MUTAȚII, SINTEZA REPARATORIE A ADN, INHIBITORII SINTEZEI ADN

10.1. RELAȚIA DINTRE STRUCTURA ȘI REPLICAREA ADN

Transmiterea informației genetice constă în dublarea cantității de ADN cromozomial, care apoi se va împărți în mod egal celulelor-fiice la diviziune. Dublarea cantității de ADN are loc în timpul perioadei S a ciclului celular și prezintă particularitatea că ADN-ul nou sintetizat copiază fidel secvența de nucleotide a ADN-ului vechi. De aceea biosinteza ADN-ului se numește *replicare*.

Mecanismul replicării nu poate fi înțeles decât dacă se cunoaște în detalii structura moleculei de ADN, descifrată de Watson și Crick (1953 a). Caracteristicile moleculei eredității sînt următoarele (fig. 10.1.):

1. Molecula de ADN este compusă din două lanțuri polinucleotidice foarte lungi, răsucite unul în jurul celuilalt într-o structură ordonată dublu-elicoïdală (numită dublu helix sau duplex de ADN). Cele două lanțuri rezultă din polimerizarea dezoxiribonucleotidelor, în așa fel încît hidroxilul 3' al ribozei unui nucleotid este legat printr-o legătură fosfodiestică de hidroxilul 5' al ribozei nucleotidului adiacent. În fiecare lanț polinucleotidic este o parte constantă („o coloană vertebrală”), reprezentată de către dezoxiriboze legate prin punți fosfodiesterice, precum și o parte variabilă — secvența bazelor. În ADN există numai 4 baze caracteristice: 2 baze purinice, adenina (A) și guanina (G) și 2 baze pirimidinice, timina (T) și citozina (C).

2. Direcția legăturilor fosfodiesterice este opusă pe cele două lanțuri, adică pe unul este 5'→3', iar pe lanțul pereche este 3'→5'. De aceea se spune că cele două lanțuri sînt *antiparalele*. Fiecare lanț are o polaritate, deoarece la un capăt are hidroxilul 5' liber, iar la capătul opus are

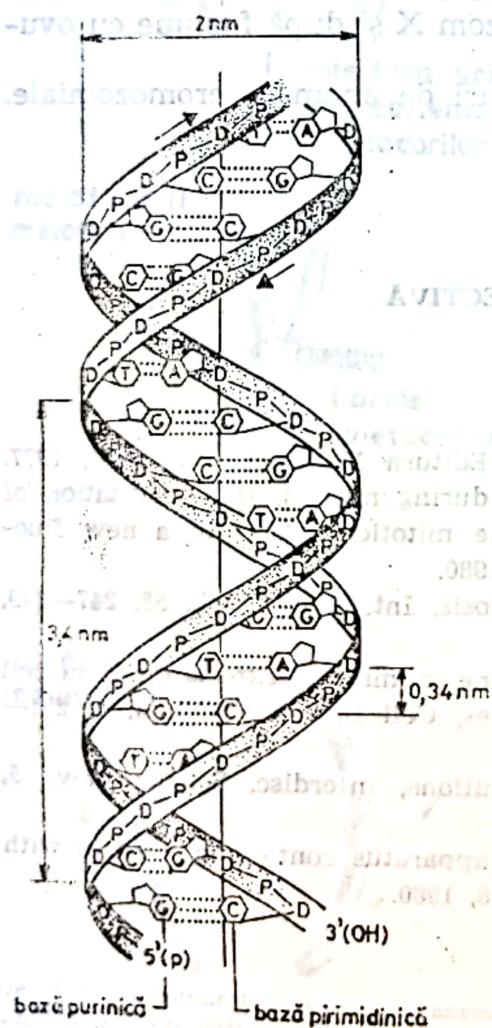


Fig. 10.1. Structura ADN-ului.

hidroxilul 3' liber. Prin convenție secvența este scrisă în direcția 5'→3' (la fel cum în proteine secvența este scrisă în direcția amino→carboxil).

3. Dezoxiribozele legate prin punțile fosfodiesterice se află la exteriorul duplexului ADN, în timp ce bazele purinice și pirimidinice se află la interiorul helixului. Bazele sînt molecule plate, care sînt așezate una peste alta, perpendicular pe axul dublei elice. Planurile dezoxiribozelor, și ele molecule plate, sînt perpendiculare pe cele ale bazelor și paralele cu axul moleculei.

4. Cele două lanțuri polinucleotidice sînt menținute împreună prin legăturile de hidrogen dintre baze. Bazele sînt dispuse în perechi: la o bază purinică de pe un lanț îi corespunde o bază pirimidinică pe lanțul opus. Unul din cele mai importante aspecte ale structurii ADN este specificitatea aranjării bazelor în perechi. Astfel adenina este legată în pereche întotdeauna cu timina, iar guanina cu citozina. Această specificitate rezultă din factori sterici și din legăturile de hidrogen. Structura regulată a duplexului ADN, cu diametrul constant de 2 nm face ca spațiul de la interior dintre cele două coloane vertebrale dezoxiriboză — fosfat să fie întotdeauna de circa 1,1 nm, adică exact cît ocupă o bază pirimidinică aranjată în pereche cu o bază purinică. Două baze purinice ar ocupa prea mult spațiu, iar două baze pirimidinice prea puțin. Specificitatea aranjării în perechi a adeninei cu timina și a guaninei cu citozina se datorează posibilității de formare în acest fel a numărului maxim de legături de hidrogen între baze: două între adenină și timină și trei între guanină și citozină. Adenina nu s-ar putea lega cu citozina, sau guanina cu timina, fiindcă aranjarea atomilor în acest caz nu ar permite formarea legăturilor de hidrogen, care asigură stabilitatea moleculei.

5. Structura helicoidală se repetă la intervale de 3,4 nm cît este pasul helixului și pe această distanță se află 10 nucleotide, deci 10 perechi de baze (0,34 nm la o bază). Numărul de perechi de baze din molecula de ADN variază de la cîteva mii pînă la cîteva milioane (3,4 milioane în cromozomul de la *E. coli*).

6. Secvența bazelor într-un lanț polinucleotidic izolat nu este supusă nici unei restricții; în schimb pe lanțul pereche va fi strict determinată de specificitatea aranjării bazelor în perechi. Deci la o anumită secvență a bazelor dintr-un lanț corespunde o secvență precisă a bazelor pe celălalt lanț, adică lanțurile sînt complementare (un lanț este complementul celuilalt, de exemplu, la secvența GCTAG corespunde pe lanțul opus CGATC).

Implicațiile descoperirii structurii în dublu helix a ADN-ului au fost enorme, deoarece, așa cum au sesizat Watson și Crick (1953 b) la o lună după publicarea primei lucrări, complementaritatea lanțurilor polinucleotidice sugerează mecanismul replicării și al transmiterii informației genetice (deci structura ADN-ului a explicat ereditatea). Dacă cele două lanțuri se despart prin ruperea legăturilor de hidrogen dintre perechile de baze, pe fiecare lanț izolat, cu bazele expuse, se poate forma un lanț

nou complementar celui vechi. Deci fiecare lanț poate servi ca *matriță* sau tipar pentru formarea unui lanț complementar cu el însuși. Dacă în molecula inițială există lanțul A, complementar cu lanțul A', după desfacerea duplexului de ADN, pe lanțul A se poate sintetiza un lanț complementar, deci A', iar lanțul A' din molecula inițială servește ca matriță pentru un lanț nou complementar A. S-a realizat în acest fel dublarea cantității de ADN, dar în același timp s-a duplicat și secvența bazelor nucleotidice (deci informația genetică este păstrată), fiecare lanț nou fiind complementar celui vechi. Astfel se produce *replicarea* ADN-ului și, deoarece molecula de ADN funcționează ca matriță pentru propria sa formare, procesul se mai numește *autoreplicare*.

Noțiunea de matriță în biologia moleculară este înțeleasă ca o macromoleculă având o suprafață specifică, adică cu locuri de legare cu o anumită configurație spațială (fig. 10.2.). Pe fiecare loc de pe matriță se poate lega în mod specific un singur fel de monomer, ce are configurația complementară cu a matriței. Asamblarea unei macromolecule pe matriță decurge în mai multe etape: a) legarea pe primul loc de pe matriță a monomerului complementar; legarea se face prin forțe slabe (legături de hidrogen, forțe Van der Waals); b) legarea pe locul vecin a unui alt monomer, complementar acestui loc; c) formarea de legături covalente între cei doi monomeri aflați pe matriță prin acțiunea unei enzime polimerizante. Apoi are loc legarea pe locul următor a unui nou monomer și se repetă etapele de mai sus, pînă cînd se assemblează o macromoleculă nouă complementară cu întreaga matriță. Acest proces intervine atât în replicarea ADN-ului, cît și în biosinteza ARN-ului și în biosinteza proteinelor.

Trebuie menționat că duplexul de ADN mai este numit ADN în *forma B*. Mai este posibilă și *forma A*, un helix tot spre dreapta orientat, precum și *forma Z* (un helix orientat spre stînga), ce apare în cazul unor secvențe GCGCGCGCGC. Nu se știe în ce măsură aceste forme A și Z apar în cromozomi și ce rol biologic au.

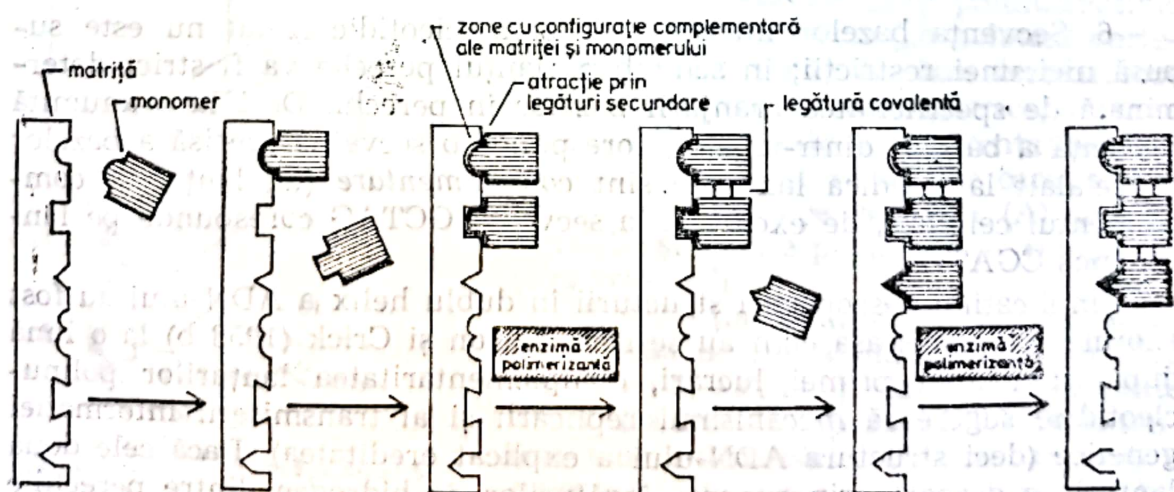


Fig. 10.2. Asamblarea unei macromolecule pe altă macromoleculă-matriță.

10.2. REPLICAREA ADN-ULUI ESTE SEMICONSERVATIVĂ.

EXPERIENȚA LUI MESELSON ȘI STAHL

Replicarea ADN-ului începe cu separarea locală a celor două lanțuri complementare. Apoi fiecare lanț servește ca matriță pentru formarea unui lanț nou prin adăugarea pas cu pas de dezoxiribonucleotide, la fiecare pas legându-se nucleotidul complementar matriței. Lanțurile fiice formate având secvența complementară cu lanțurile din molecula mamă, informația genetică este duplicată în întregime. Rezultă 4 lanțuri, deci se pot forma două duplexuri de ADN identice cu duplexul parental ce a servit ca matriță. Teoretic, pot exista două tipuri de replicare: conservativă și semiconservativă. Dacă lanțurile noi sintetizate prin replicare ar forma un duplex separat, iar lanțurile matriță refac duplexul vechi, replicarea ar fi *conservativă* (deoarece una din moleculele ce rezultă din replicare conservă pe deplin molecula veche). Dacă însă fiecare moleculă fiică are doar un lanț din duplexul parental și un lanț nou, replicarea se numește *semiconservativă* (deoarece fiecare moleculă ce rezultă din replicare conservă jumătate din molecula veche).

Dovada că replicarea este semiconservativă a fost adusă printr-o experiență celebră în biologia moleculară de către Meselson și Stahl (1958) (fig. 10.3.).

Bacteria *E. coli* a fost cultivată timp de mai multe generații pe un mediu în care unica sursă de azot era $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, ceea ce a dus la încorporarea izotopului greu ^{15}N în ADN-ul bacteriei. Apoi s-au transferat bacteriile pe un mediu cu $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$, deci în lanțurile de ADN nou sintetizate va intra ^{14}N . S-a extras ADN-ul din *E. coli* la diferite intervale de timp după trecerea pe mediul cu ^{14}N și s-a analizat prin tehnica centrifugării în gradient de densitate. Dacă într-un tub de centrifugă se pune

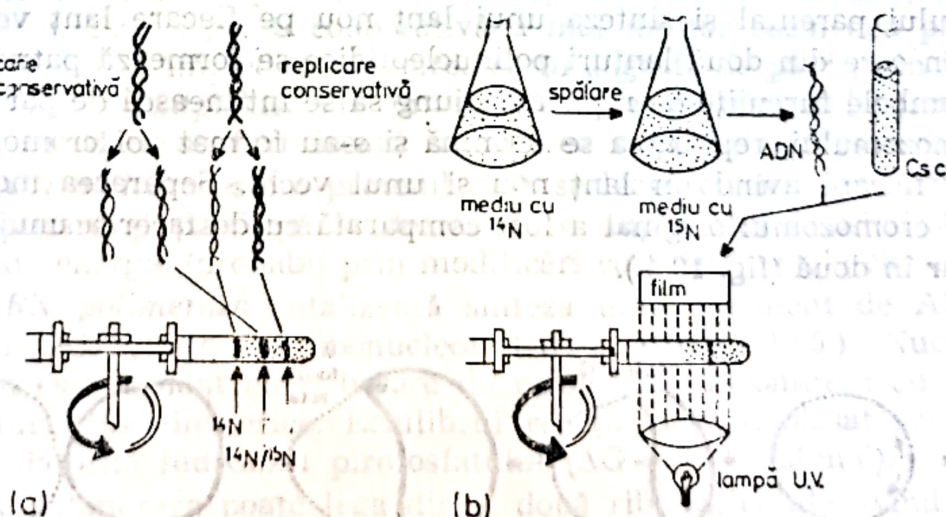


Fig. 10.3. Două mecanisme posibile de replicare (a) și diferențierea prin centrifugare în gradient de CsCl și demonstrarea de către Meselson și Stahl a replicării semiconservative (b).

o soluție de CsCl cu densitatea de $1,7 \text{ g/cm}^3$, în cursul centrifugării CsCl sedimentează, astfel că la suprafața tubului de centrifugă densitatea devine mai mică ($1,65 \text{ g/cm}^3$), iar la fundul tubului mai mare ($1,76 \text{ g/cm}^3$). ADN-ul plasat în CsCl se va distribui în zona ce corespunde cu densitatea lui proprie, iar poziția sa se poate stabili prin fotografiere în urma iluminării tubului de centrifugă cu lumină ultravioletă; deoarece ADN-ul absoarbe radiațiile UV, poziția sa va fi marcată de o bandă pe film. Evident că ADN cu ^{15}N dă o bandă aflată mai spre fundul tubului de centrifugă, iar ADN cu ^{14}N o bandă aflată mai spre suprafață.

După o generație (deci când s-a produs o singură replicare a ADN-ului) ADN-ul extras din *E. coli* a dat o singură bandă la centrifugare, cu o poziție intermediară între ADN cu ^{15}N și cel cu ^{14}N (fig. 10.3.). Aceasta înseamnă că ADN-ul format în cursul replicării este hibrid, are un lanț cu ^{15}N și unul cu ^{14}N . Înseamnă că replicarea este semiconservativă, fiecare moleculă avînd un lanț nou și unul vechi. Experiența lui Meselson și Stahl a confirmat deci modelul replicării semiconservative propus de Watson și Crick și a infirmat ipoteza replicării conservative (caz în care trebuie să apară două benzi la centrifugare).

Replicarea ADN-ului în cromozomul bacteriei *E. coli* s-a putut vedea la microscop folosindu-se tehnica de autoradiografie. *E. coli* a fost crescută pe un mediu cu timină marcată cu tritium (^3H) timp ceva mai lung ca cel necesar pentru două generații. Apoi bacteriile au fost lizate, produșii de liză au fost fixați pe hîrtie de filtru (prin sedimentare), aceasta s-a plasat pe o lamă de microscop, acoperită cu un film fotografic și păstrată circa 2 luni. Traiectul ADN-ului este marcat prin înnegrirea emulsiei datorită electronilor emiși de ^3H încorporat în ADN.

Replicarea începe întotdeauna în același punct numit *origine*, de unde pleacă într-o parte și în alta cîte o *furculiță de replicare*. Furculița de replicare este locul parental în care se produce simultan dezrăsucirea ADN-ului parental și sinteza unui lanț nou pe fiecare lanț vechi (deci locul în care din două lanțuri polinucleotidice se formează patru lanțuri). Cînd ambele furculițe de replicare ajung să se întîlnească de partea opusă a cromozomului, replicarea se termină și s-au format doi cromozomi circulari, fiecare avînd un lanț nou și unul vechi. Separarea moleculelor noi de cromozomul original a fost comparată cu desfacerea unui fermoar circular în două (fig. 10.4.).

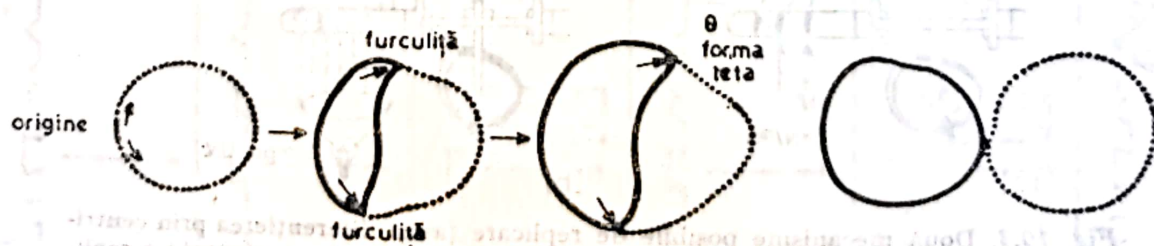


Fig. 10.4. Reprezentarea schematică a replicării cromozomului circular la *E. coli*.

10.3. ENZIMELE ȘI PROTEINELE CARE INTERVIN ÎN SINTEZA ADN

Există mai multe proteine, unele cu activități enzimatică, care colaborează la sinteza lanțurilor noi de ADN. Acestea sînt mai bine caracterizate la procariote, la care de altfel au și fost descoperite.

1. *ADN topoizomerazele*. Pentru a se produce replicarea duplexului de ADN trebuie să se dezmădă. Avînd în vedere structura ADN-ului, la fiecare 10 perechi de baze replicate, duplexul parental ar trebui să facă o rotație completă în jurul axei sale. Pentru ca furculița de replicare să înainteze ar trebui ca întregul cromozom „înaintea” furculiței să se rotească rapid, ceea ce ar impune consum foarte mare de energie. În realitate *ADN topoizomerazele* scindează reversibil duplexul de ADN permițînd astfel rotația și îndepărtarea tensiunii acumulate în timpul dezmădării lanțurilor polinucleotidice. Există două tipuri de astfel de proteine:

a. *ADN topoizomerazele de tipul I* scindează temporar un singur lanț de ADN, proteina legîndu-se de capătul tăiat. După ce are loc rotația celor două porțiuni de duplex, legătura fosfodiestică se reface în lanțul polinucleotidic, iar proteina se desprinde de ADN. Deci acționează ca o „nuclează reversibilă”.

b. *ADN topoizomerazele de tipul II* se leagă de ambele lanțuri dintr-un duplex, pe care le scindează reversibil, permițînd ca un alt duplex de ADN să treacă prin „spărtură”, după care topoizomeraza reface duplexul tăiat. Aceste proteine sînt foarte utile atunci cînd trebuie „des-cilcit” un nod într-o moleculă circulară de ADN sau cînd trebuie separate două molecule înlăntuite.

2. *Proteinele de destabilizare a helixului* se leagă de lanțul polinucleotidic izolat din duplex (deci după separarea celor două lanțuri polinucleotidice). Prin legarea cooperativă a mai multor asemenea proteine pe lanțul izolat se împiedică răsucirea sa în „agrafă de păr” (prin formarea de perechi complementate între bazele de pe același lanț; vezi și cap. 11). Totodată se favorizează desfacerea duplexului (destabilizarea).

3. *ADN helicaza* este o proteină care se leagă cu un „ic” în furculița de replicare și participă la dezmădarea duplexului folosind ATP-ul ca sursă de energie (probabil prin modificări conformaționale ciclice).

4. *ARN polimeraza* catalizează sinteza unui fragment de ARN pe matriță de ADN, folosind ribonucleotidtrifosfați (fig. 10.5). Nucleozidtrifosfatul este scindat cu eliberare de pirofosfat concomitent cu formarea legăturii fosfodiestică. Echilibrul reacției este deplasat spre polimerizare datorită hidrolizei pirofosfatului ($\Delta G = -33$ kJ/mol).

ARN polimeraza poate lega direct două ribonucleotide avînd bazele complementare cu cele de pe matrița de ARN, apoi adaugă alte nucleotide formînd un fragment scurt de ARN numit *primer*. Acesta, avînd capătul 3'OH liber, permite începerea activității ADN-polimerazei.

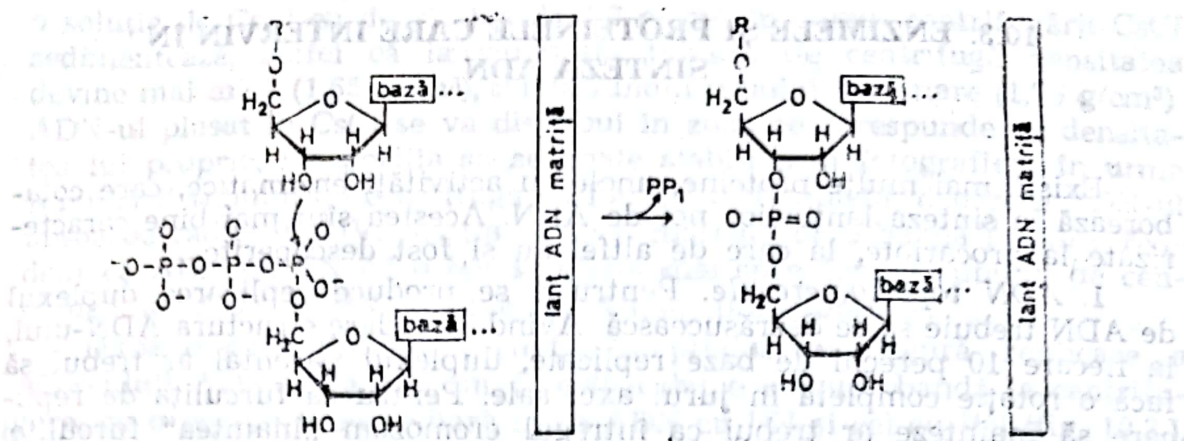


Fig. 10.5. Reacția catalizată de ARN polimeraza.

Deoarece catalizează formarea unui primer, ARN polimeraza ce intervine în biosinteza ADN se numește **ADN primază**.

5. **ADN polimerazele** catalizează polymerizarea dezoxiribonucleotidelor. În ordinea descoperirii lor la *E. coli* se cunosc următoarele 3 polimeraze: I, II și III.

a. **ADN polimeraza I (pol I)** a fost prima descoperită (de Kornberg în 1955) și s-a crezut că este principala enzimă de sinteză a ADN. Descoperirea ulterioară a unei tulpini de *E. coli* la care activitatea lipsea, dar replicarea ADN se desfășura normal, a orientat cercetările spre identificarea rolului pol I în procesele respiratorii ale ADN și spre izolarea adevăratei replicaze.

Pol I catalizează trei reacții. Prima este adăugarea pas cu pas a câte unui dezoxiribonucleotid la gruparea 3'OH liberă a unui primer de ARN sau ADN. Reacția se desfășoară pe matrită de ADN, fiind similară cu cea catalizată de ARN polimerază în sensul folosirii unui nucleozid-trifosfat și a energiei rezultate din hidroliza pirofosfatului (fig. 10.6). Spre deosebire însă de ARN polimerază, care poate lega și două nucleot-

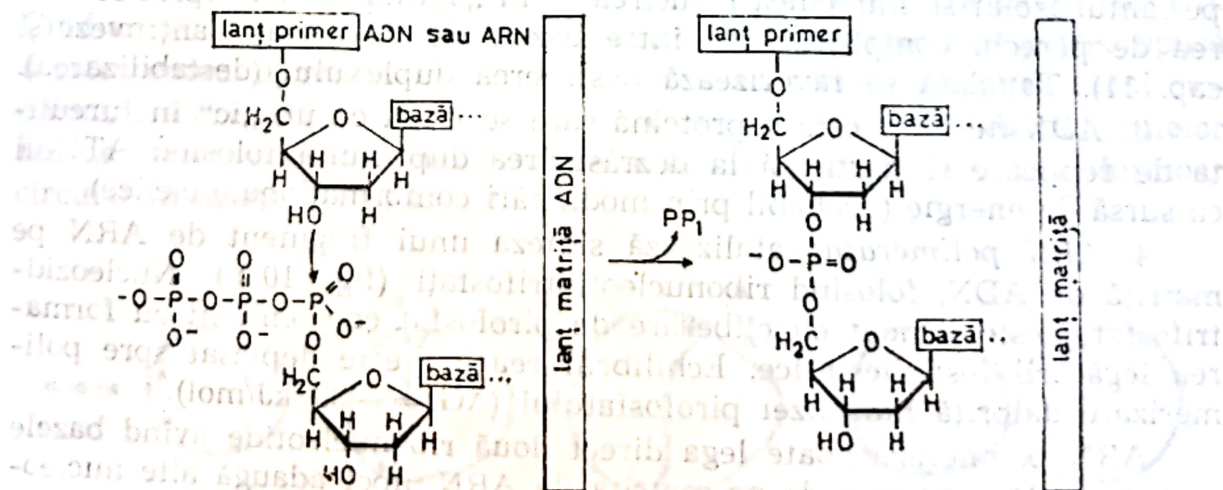


Fig. 10.6. Adăugarea unui dezoxiribonucleotid la capătul unui primer de ADN sau ARN, pe matrită de ADN, reacție catalizată de ADN polimeraza I.

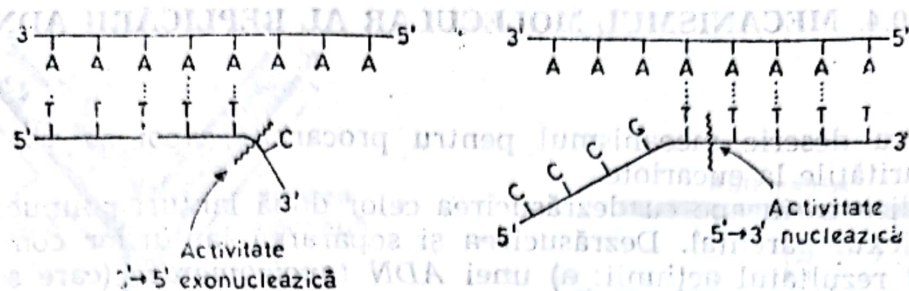


Fig. 10.7. Activitățile $3' \rightarrow 5'$ exonucleazică și $5' \rightarrow 3'$ nucleazică ale ADN polimerazei I.

tide unul de altul, ADN polimeraza necesită un primer la capătul căruia să lege nucleotidul.

A doua reacție catalizată de Pol I este *activitatea $3' \rightarrow 5'$ exonucleazică*, prin care se îndepărtează un nucleotid ce a fost greșit inserat la capătul $3'$ al unui primer. Deci se îndepărtează un nucleotid terminal de pe lanțul nou de ADN, dacă acest nucleotid nu este complementar bazei de pe matriță (fig. 10.7.).

A treia reacție catalizată de Pol I este tot de corectare a greșelilor ce pot apare în replicare și anume *activitatea $5' \rightarrow 3'$ nucleazică*, prin care se îndepărtează mai multe nucleotide dispre capătul $5'$ terminal dintr-un lanț de ADN, dacă acest capăt nu este complementar lanțului matriță. Pentru siguranță se îndepărtează și un nucleotid corect inserat.

Pol I are ca principal rol cel de corectare a greșelilor ce pot apare în replicare, deci în sinteza reparatorie a ADN-ului.

b. *ADN polimeraza II (pol II)* prezintă activitatea polimerazică și cea $3' \rightarrow 5'$ exonucleazică și joacă probabil rol reparativ, deși există mutante la care lipsește fără a fi afectată viabilitatea bacteriei.

c. *ADN polimeraza III (pol III)* prezintă numai activitatea polimerazică și cea $3' \rightarrow 5'$ exonucleazică. Rolul său este astăzi clar, ea fiind *principala enzimă de replicare (principala replicază)*. Mutantele de *E. coli* la care lipsește pol III nu sînt viabile.

6. *ADN ligaza* leagă două capete ale unor fragmente de ADN ce fac parte dintr-un duplex de ADN. Se formează puntea fosfodiestică între gruparea OH din poziția $3'$ a unui fragment și fosfatul din poziția $5'$ a celui alt fragment (fig. 10.8.). Reacția este opusă scindării catalizată de topoizomeraze dar similară cu refacerea lanțului produsă de acestea. Există însă o deosebire importantă: ADN ligaza necesită energie, donată de ATP în celulele animale și la bacteriofagi și de către NAD^+ la bacterii.

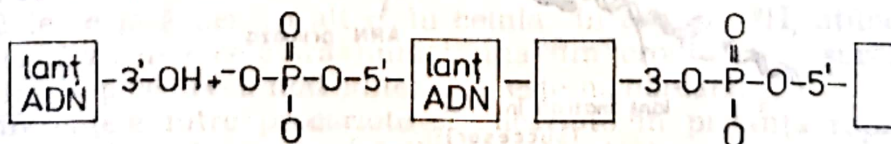


Fig. 10.8. Reacția catalizată de ADN ligază.

10.4. MECANISMUL MOLECULAR AL REPLICĂRII ADN

Se va descrie mecanismul pentru procariote, apoi se vor preciza particularitățile la eucariote.

Replicarea începe cu dezrăsucirea celor două lanțuri polinucleotidice din duplexul parental. Dezrăsucirea și separarea lanțurilor complementare sînt rezultatul acțiunii: a) unei ADN *topoizomerase* (care scindează unul din lanțuri la o distanță de circa 3 nm de furculița de replicare în direcția opusă replicării); b) ADN *helicazei* și c) *proteinelor de destabilizare a helixului*, numite și *proteine de dezrăsucire* sau *proteine de legare pe lanțul izolat de ADN*, „*helix-destabilizing proteins*“, „*single-strand DNA-binding proteins*“ (fig. 10.9.).

Cele două lanțuri parentale fiind separate, fiecare din ele poate servi ca matriță pentru sinteza unui lanț nou complementar cu matrița. Deoarece lanțurile din duplexul parental sînt antiparalele, înseamnă că la replicare unul din lanțurile nou formate să crească în direcția $5' \rightarrow 3'$, iar celălalt în direcția $3' \rightarrow 5'$. Dar ADN polimerazele nu pot acționa decît în direcția $5' \rightarrow 3'$. În această situație sinteza ADN-ului se face diferit pe cele două lanțuri matriță (adică furculița de replicare este asimetrică). (fig. 10.10.). Pe unul din lanțuri ADN polimeraza III realizează probabil sinteza continuă pe direcția $5' \rightarrow 3'$. Acesta este *lanțul matriță conducător* (sau *director*, „*leading-strand template*“). Pe lanțul matriță opus, numit *întîrziat* sau *succesor* („*lagging-strand template*“) sinteza ADN-ului se desfășoară *discontinuu*, în fragmente scurte ce se assemblează tot pe direcția $5' \rightarrow 3'$ și care apoi sînt unite la capete (dînd impresia creșterii lanțului succesor pe direcția $3' \rightarrow 5'$). Fragmentele scurte de ADN se numesc *fragmente Okazaki*, după numele descoperitorului și la procariote ele au o lungime de circa 1000—2000 nucleotide. Fiecare fragment Okazaki se assemblează în următoarele faze (fig. 10.11.): a) ARN primaza începe sinteza formînd un *primer* de ARN (de circa 100—200 nucleotide); b) la capătul $3'OH$ al primerului ADN pol III sintetizează un fragment

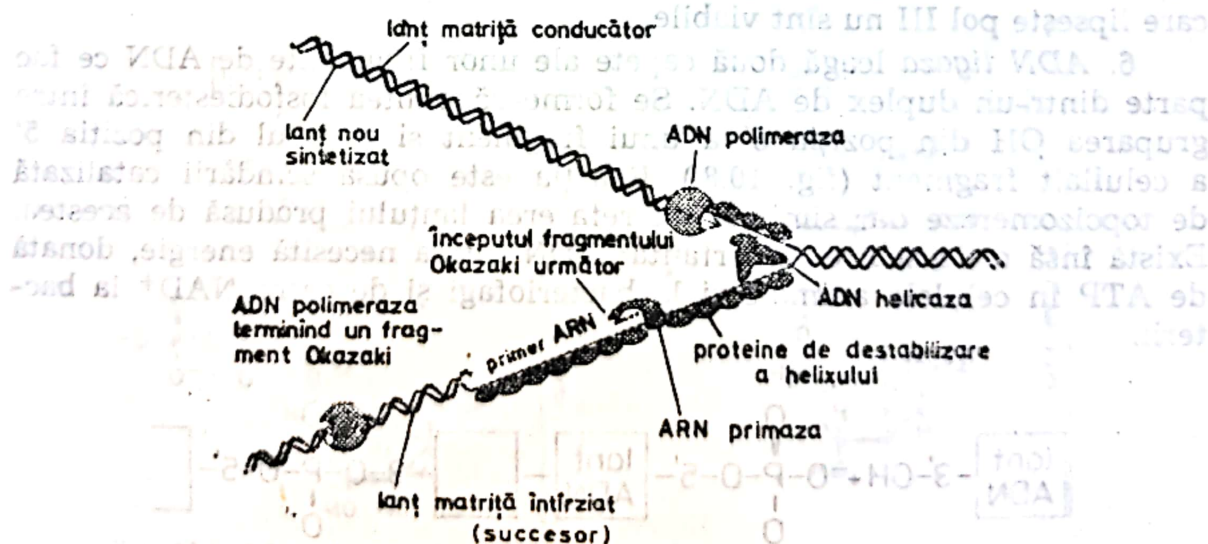


Fig. 10.9. Diagrama furculiței de replicare.

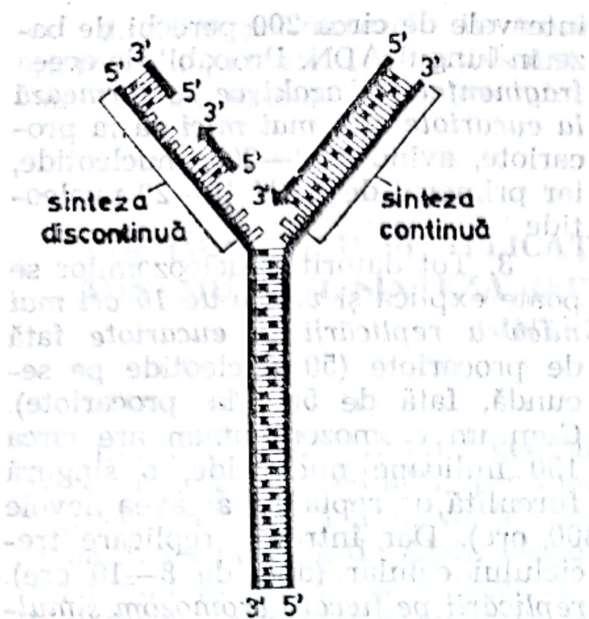


Fig. 10.10. Reprezentarea schematică a sintezei continue pe lanțul matriță conducător și a celei discontinuă pe lanțul succesor.

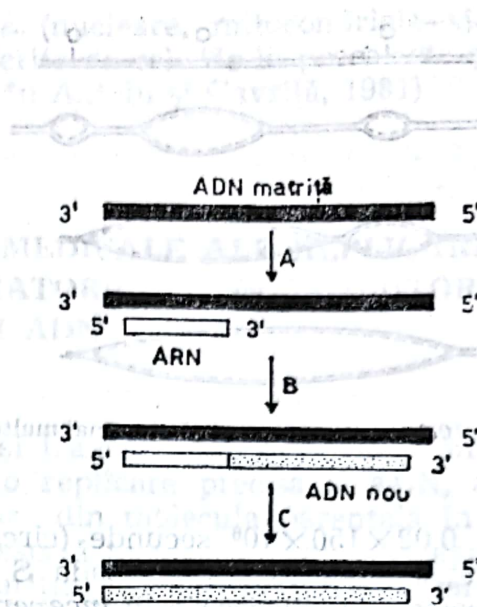


Fig. 10.11. Reprezentarea simplificată a sintezei unui fragment Okazaki.

de ADN complementar matriței; c) *ADN Pol I* îndepărtează pas cu pas cite un ribonucleotid din primer înlocuindu-l cu dezoxiribonucleotidul complementar matriței.

În final fragmentele Okazaki sînt legate la capete prin *ADN-ligază*. De menționat că există și păreri după care sinteza pe ambele lanțuri matriță decurge discontinuu, ADN pol III „sărind” la nivelul bifurcației de pe un lanț matriță pe celălalt (vezi disc. în ref. Antohi și Gavrilă, 1981).

10.5. PARTICULARITĂȚILE REPLICĂRII LA EUCARIOTE

Deși mecanismul expus se referă la procariote (*E. coli* în primul rînd) și la eucariote replicarea este similară. Există însă și unele particularități.

1. Replicarea este semiconservativă și la eucariote, ceea ce s-a demonstrat prin autoradiografie pe rădăcina unei plante incubate într-o soluție de timidină marcată cu ^3H . Dacă se examinează cromozomii în metafază, se observă că ambele cromatide surori sînt marcate cu ^3H . Dacă însă celulele se lasă pentru alt ciclu celular în absența ^3H , atunci la cea de a doua diviziune celulară numai una din cromatidele surori apare marcată, în timp ce aceea nou sintetizată este nemarcată.

2. Diferențele între procariote și eucariote în privința replicării se datorează complexității organizării cromatinei la eucariote, la care ADN-ul este complexat cu histone în nucleozomi, care se succed la

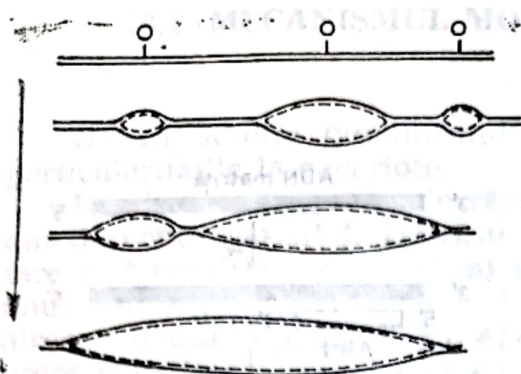


Fig. 10.12. Începerea replicării în mai multe puncte la eucariote.

de: $0,02 \times 150 \times 10^6$ secunde (circa 800 ore). Dar întreaga replicare trebuie să aibă loc în perioada S a ciclului celular (decă de 8—10 ore). Aceasta se realizează prin *începerea replicării pe fiecare cromozom simultan în mai multe puncte de origine* (circa 100 pe fiecare cromozom uman). Două puncte de origine vecine sînt separate de 30.000—300.000 nucleotide (perechi de baze).

La fiecare origine apar două furculițe de replicare ce se deplasează pe direcții opuse în lungul cromozomului. Apar astfel structuri ca niște „ochi”, numite *bule de replicare* (fig. 10.12).

4. În lungul cromozomului originile furculițelor de replicare nu apar la întîmplare, ci în grupe de 20—80, situate toate într-o anumită zonă a cromozomului. Fiecare grupă se numește *unitate de replicare* (sau *replicon*). Repliconii se activează treptat în decursul fazei S a ciclului celular. Zonele de heterocromatină sînt utimele activate.

Furculițele de replicare se deplasează cu aceeași viteză în tot cursul fazei S. Cînd ele ajung să se întîlnească pe tot cromozomul, replicarea se termină și se despart cei doi cromozomi.

5. Replicarea ADN-ului are loc paralel cu sinteza de histone care spre deosebire de alte proteine din celulă sînt sintetizate numai în faza S a ciclului celular. Se pare că odată sintetizate și asamblate în nucleozomi, histonele nu mai părăsesc ADN-ul de care s-au legat. Astfel, în cursul replicării miezul nucleozomului rămîne asociat de ADN și toți miezii vechi trec numai pe unul din duplexuri, în timp ce pe celălalt duplex de ADN se leagă numai miezi nou sintetizați (fig. 10.13.). Nu se știe precis cum are loc acest proces de segregare a histonelor și cum trece furculița de replicare prin zona miezului.

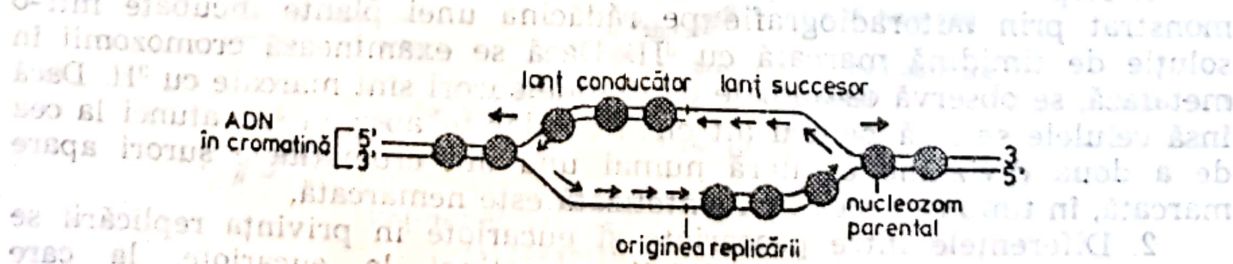


Fig. 10.13. Segregarea nucleozomilor în timpul replicării ADN-ului.

intervale de circa 200 perechi de baze în lungul ADN. Probabil de aceea fragmentele Okazaki ce se formează la eucariote sînt mai mici ca la procariote, avînd 100—200 nucleotide, iar primerul de ARN 10—20 nucleotide

3. Tot datorită nucleozomilor se poate explica și viteza de 10 ori mai mică a replicării la eucariote față de procariote (50 nucleotide pe secundă, față de 500 la procariote). Cum un cromozom uman are circa 150 milioane nucleotide, c singură furculița de replicare ar avea nevoie

6. ADN polimerazele la eucariote (nucleare, mitocondriale și din cloroplaste), notate α , β , γ , și δ sînt diferite de cele de la procariote și nu au activități exonucleazice (vezi detalii în Antohi și Gavrilă, 1981).

10.6. IMPLICAȚII ȘI APLICAȚII MEDICALE ALE REPLICĂRII ADN: MUTAȚII, SINTEZA REPARATORIE A ADN, INHIBITORII SINTEZEI ADN

Conservarea informației genetice și transmiterea ei fidelă la urmași ce stau la baza eredității, presupun o replicare precisă a ADN, adică reproducerea fidelă a secvenței de baze din molecula parentală în cele două molecule fiice de ADN. Orice greșeală în replicare duce la apariția unor mutații. Un anumit nivel de apariție a mutațiilor (în general scăzut) a fost un proces necesar în evoluția speciilor. Dar peste o anumită limită mutațiile fac imposibilă viața celulei sau duc la o proliferare necontrolată a celulelor (cancer). Tocmai de aceea celulele (atît procariotele, cît și eucariotele) au numeroase sisteme de enzime de reparare a erorilor ce pot apare în ADN spontan sau induse de agenți chimici și fizici. Mecanismele reparatorii ale ADN sînt foarte eficiente, considerînd că o greșeală în replicare se produce numai o dată la un milion de replicări ale genelor.

Mutațiile pot fi punctiforme (alterarea unui singur nucleotid) sau mai complexe (inclusiv lipsa unor secvențe din ADN, numite deleții, sau secvențe în plus, numite inserții).

Mutații punctiforme pot apare spontan în ADN. Astfel, deaminarea (prin hidroliză) duce la transformarea citozinei în uracil, deci la replicare o pereche C—G va fi înlocuită cu A—T fiindcă uracilul poate forma pereche complementară cu adenina.

Prin hidroliză spontană se produce și depurinarea, proces prin care adenina sau guanina sînt rupte din ADN. Aceasta este cea mai frecventă leziune din ADN, circa 5000 baze purinice fiind pierdute pe zi în fiecare celulă umană, față de 100 deaminări.

Repararea leziunilor produse prin deaminare implică în prima etapă îndepărtarea bazei modificate, prin hidroliza legăturii ei cu dezoxiriboza. Aceasta o fac enzimele numite ADN glicozilaze, din care s-au identificat circa 20, fiecare specifică unei anumite modificări a bazelor. După acțiunea ADN glicozilazei, în duplexul de ADN rămîne o leziune similară cu cea produsă prin depurinare (lipsește o bază). Repararea se face prin excizia zonei în care lipsește baza, urmată de sinteza unui fragment corect de ADN de către ADN polimeraza reparatorie, iar în final ADN ligaza unește fragmentul nou cu cel vechi din același lanț.

Pe lîngă leziunile spontane în ADN pot apare cu frecvență mult mai mare mutații induse de agenți chimici și fizici. Acești agenți mutageni sînt în majoritatea cazurilor și cancerigeni. Lista substanțelor chimice mutagene este în continuă creștere (chiar și vitamina C și oxigenul în

concentrații mari au efecte mutagene în culturi de celule). Unele substanțe chimice modifică direct bazele din ADN. Astfel *agenții alchilanți* fixează radicali alchil (metil, etil etc.) în ADN. Pe de o parte agenții alchilanți sînt cancerigeni, dar pe de altă parte celulele maligne sînt mult mai sensibile la acțiunea agenților alchilanți. Dacă celulele normale pot repara leziunile produse de agenții alchilanți, cele maligne au mecanismele de reparare deficitare. De aceea unii agenți alchilanți (derivați nitrozoureei) sînt folosiți în chimioterapia cancerului. Mai mult, se poate încerca în laborator, pe culturi de celule, sensibilitatea la agenții alchilanți a diferitelor celule maligne.

Alte substanțe chimice mutagene se intercalează între perechile de baze din ADN distorsionînd duplexul, ceea ce duce la erori în replicare. Astfel sînt *acriflavinele* și *cafeina*. După intercalare în ADN unele substanțe stabilesc punți între cele două lanțuri polinucleotidice (legături covalente). Unele substanțe ce produc punți se folosesc în chimioterapia cancerului: *mitomicina C*, *sărurile de platină*.

O altă substanță, *psoralenul* (extrasă din plante) este folosită pentru tratarea unei boli de piele numită psoriazis. Administrat *per os* ajunge în celulele bolnave din piele, se intercalează în ADN, iar la iradierea pielii cu radiații UV se stabilesc punțile covalente și celulele bolnave mor.

Există o boală genetică în care sînt deficitare mecanismele de reparare a leziunilor de către substanțele ce stabilesc punți între lanțuri. Boala este *anemia Fanconi* (anemie severă, retardarea creșterii, deficite imunitare grave, apariție frecventă a unor forme de cancer: leucemii, cancer de piele și ficat).

Dintre agenții fizici radiațiile ultraviolete și cele ionizante produc leziuni importante în ADN. *Radiațiile UV* cu lungimea de undă în jur de 300 nm au o energie pe foton similară unei legături covalente. Deoarece acizii nucleici absorb puternic radiațiile UV, se produce în ADN o leziune caracteristică, *dimerizarea timinei* (sau în general a pirimidinelor). Două timine de pe același lanț polinucleotidic sînt legate prin legături covalente, rezultînd un dimer ce distorsionează duplexul de ADN blocînd replicarea (fig. 10.14). Celulele au sisteme de reparare a leziunilor produse de UV, fiindcă acestea se produc în mod continuu (deși majoritatea radiațiilor UV din lumina solară sînt oprite de ozonul din atmosferă superioară, o parte ajung totuși pe Pămînt).

Leziunile de acest tip (voluminoase față de mutațiile punctiforme) sînt reparate printr-un sistem ce implică cel puțin 5 enzime (fig. 10.15). La început se face o scindare a lanțului nucleotidic, apoi excizia zonei cu dimerul, urmează apoi refacerea unui lanț corect printr-o ADN polimerază reparatorie și în final intervine ADN ligaza.

Dacă există deficiențe în aceste procese reparatorii față de UV, apare

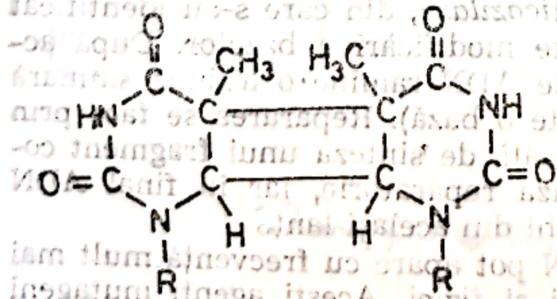


Fig. 10.14. Dimeri de timină formați sub acțiunea razelor UV.

boala genetică de piele *xeroderma pigmentosum*. Din copilărie apar pe piele și pe corneea zone uscate și atrofice, care după un timp se malignizează și bolnavii mor de tineri prin metastaze. Defectul molecular (cu variante multiple) constă în imposibilitatea îndepărtării zonelor cu dureri de timină.

Radiațiile ionizante pot fi radiații electromagnetice cu lungime de undă foarte mică (razele X sau γ), electroni (razele β) sau nucleei de heliu accelerați (razele α). Ele au o proprietate comună de a smulge electronii din atomi și astfel se produc ioni și radicali liberi. Leziunile produse de radiațiile ionizante sînt complexe: ruperea unuia sau a ambelor lanțuri de ADN, pierderi de baze, modificări ale bazelor sau ale dezoxiribozei. Celulele normale au și față de asemenea leziuni sisteme reparatorii.

Există însă o boală genetică *ataxia telangiectasia* (lipsă de coordonare a mișcărilor, dilatații ale vaselor vizibile ca pete roșii pe piele) în care numai repararea leziunilor produse de radiațiile ionizante este anormală (nu și cea față de radiațiile UV). Există și deficite imunitare grave, ceea ce diminuează capacitatea de îndepărtare a celulelor canceroase. În consecință apar cancere, în special leucemii, cu frecvență mare.

Radiațiile ionizante sînt folosite în radioterapia cancerului, deoarece celulele care proliferază rapid, cum sînt cele maligne, sînt foarte sensibile la radiații. Aceasta deoarece procesele reparatorii ale ADN necesită un anumit interval de timp spre a se produce. Dacă celula proliferază foarte rapid, există posibilitatea să înceapă un ciclu nou de replicare înainte ca repararea să fie completă.

Inhibitorii biosintezei ADN-ului au importanță nu numai fundamentală (în studiul mecanismelor replicării), ci și în practica medicală, fiind folosiți ca substanțe antibiotice (antimicrobiene și antivirale) și antitumorale (citostatice).

Un antibiotic sau *chimioterapic* poate fi definit ca o substanță ce împiedică multiplicarea bacteriilor, avînd o acțiune selectivă la nivel molecular, astfel încît să fie activ în doze mici, care pe cît posibil să nu afecteze același proces molecular (dacă acesta există) în organismul uman. Dintre antibioticele antimicrobiene ce inhibă biosinteza ADN-ului este de subliniat *acidul nalidixic*, folosit pe scară largă în practică, precum și *edinele* și *novobiocina*, antibiotice promițătoare.

Acidul fosfonoacetic este un agent antiviral, ce inhibă selectiv ADN polimerazele virale; acestea sînt enzime codificate de materialul genetic al virusului și a căror sinteză este indusă în celula gazdă după infectare.

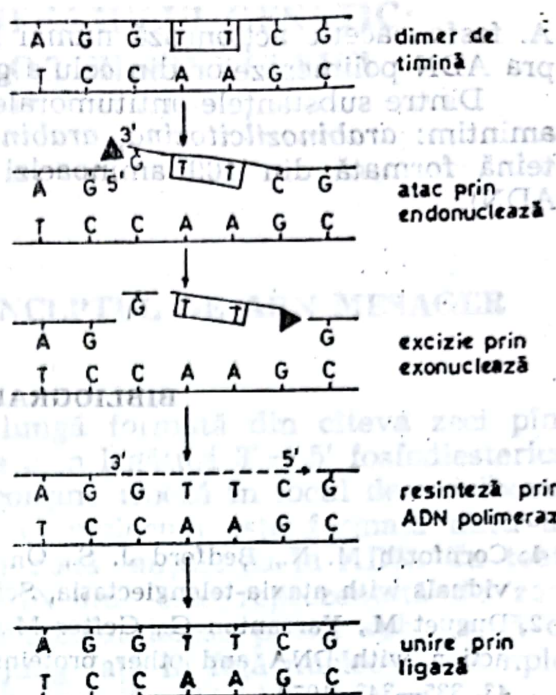


Fig. 10.15. Schema reparării ADN (încercarea dimerilor de timină).

A. fosfonoacetic acționează numai în concentrații mult mai mari și asupra ADN polimerazelor din celula gazdă.

Dintre substanțele antitumorale, ce acționează inhibând sinteza ADN, amintim: *arabinozilitozina*, *arabinoziladenina* și *neocarcinostatina* (proteină formată din 109 aminoacizi ce produce rupturi în molecula de ADN).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Cornforth M. N., Bedford J. S., On the nature of a defect in cells from individuals with ataxia-telangiectasia, *Science*, 227, 1589—1591, 1985.
2. Duguet M., Yarranton G., Geffer M., The *rep* protein of *Escherichia coli*: interaction with DNA and other proteins, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 43, 335—343, 1979.
3. Kornberg A., *DNA Replication*, Freeman, San Francisco, 1980.
4. Lehmann A. R., Karran P., DNA repair, *Int. Rep. Cytol.*, 72, 101—146, 1981.
5. Meselson M., Stahl F. W., The replication of DNA in *E. coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 44, 671—682, 1958.
6. Nakayama T., Kaneko M., Kodama M., Nagata C., Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells, *Nature*, 314, 462—464, 1985.
7. Waring M. J., DNA modification and cancer, *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 159—192, 1981.
8. Watson J. D., Crick F. H. C., Molecular structure of nucleic acids, A structure for deoxyribonucleic acid, *Nature*, 171, 737—738, 1953 a.
9. Watson J. P., Crick F. H. C., General implications of the structure of deoxyribonucleic acid, *Nature*, 171, 964—967, 1953.
10. Weissbach A., The functional roles of mammalian DNA polymerase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 198, 386—396, 1979.

11. TRANSCRIEREA MESAJULUI GENETIC: BIOSINTEZA ACIZILOR RIBONUCLEICI

11.1. STRUCTURA ARN ȘI CONCEPTUL DE ARN MESAGER

ARN-ul este o macromoleculă lungă formată din câteva zeci până la câteva mii de ribonucleotide legate prin legături $3' \rightarrow 5'$ fosfodiesterice. Diferă de ADN în trei privințe: a) conține riboză în locul dezoxiribozei; b) conține uracil în loc de timină; c) molecula este formată dintr-un singur lanț polinucleotidic și nu din două lanțuri ca la ADN. Cu toate acestea circa 50% din structura ARN-ului este reprezentată de zone de dublu helix, deoarece lanțul polinucleotidic se pliază sub formă de bucle, „în agrafe de păr”, în care ajung față în față nucleotide complementare: adenină-uracil și guanină-citozină (fig. 11.1).

Există trei tipuri de ARN: ARN ribozomal (rARN) în constituția ribozomilor, ARN de transfer (tARN) ce transportă aminoacizii într-o formă activată la ribozom și ARN mesager (mARN). Acesta din urmă este cel care preia informația genetică de pe ADN și o transportă în citoplasmă.

Conceptul de ARN mesager a fost introdus în 1961 de Jacob și Monod. Luând în considerare că genele se află în nucleu, iar sinteza proteinelor (exprimarea genelor) se face în citoplasmă, ei au propus existența unei molecule mesager, care preia informația de pe genă și o transportă în citoplasmă la ribozom, sediul biosintezei proteinelor. Jacob și Monod au propus că acest intermediar, mesager al genei, este o specie de ARN cu viață scurtă, care este sintetizat pe matricea de ADN. Deci mARN preia secvența de baze dezoxiribonucleotidice de pe genă transcrisă într-o secvență complementară de baze ribonucleotidice. La rândul său mARN va servi ca matrice pentru sinteza proteinei codificată de gena respectivă. Acest concept este deci inclus în dogma centrală a biologiei moleculare (vezi cap. 8).

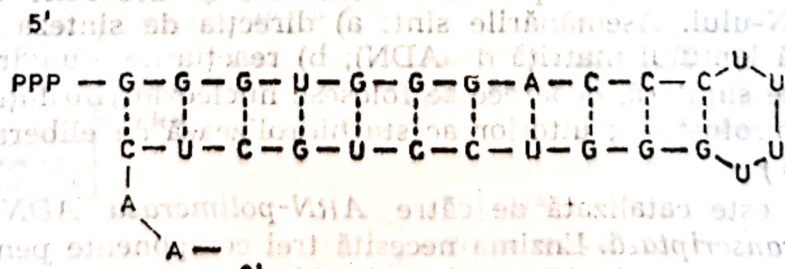


Fig. 11.1. Diagrama plierii lanțului de ARN în „agrafă de păr” cu formarea zonei de dublu helix.

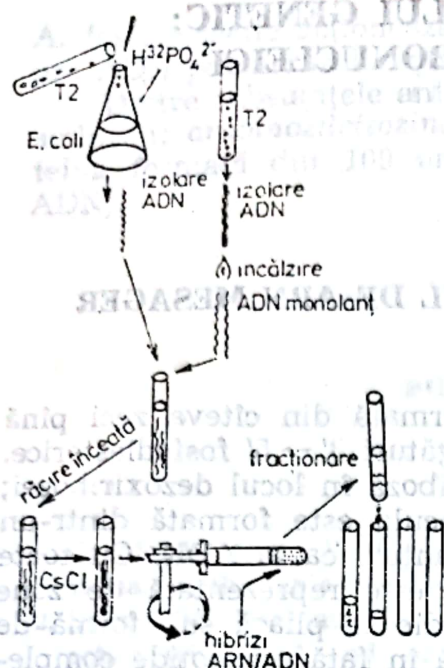


Fig. 11.2. Experiența lui Spiegelman.

de ARN și unul de ADN). Formarea moleculelor hibrid ARN—ADN are loc strict numai cu ADN-ul fagului T2 (cu care s-a infectat bacteria) și nu cu ADN din alți bacteriofagi.

Experiența a demonstrat deci că ARN-ul sintetizat în *E. coli* după infecția cu fagul T2 are o secvență complementară cu ADN-ul fagului, deci că mARN-ul postulat de Jacob și Monod are o existență reală. În plus, Spiegelman a mai introdus tehnica hibridizării, în care ulterior s-a demonstrat că și tARN și rARN sînt sintetizați pe matrice de ADN.

11.2. MECANISMUL MOLECULAR AL BIOSINTEZEI ARN-ULUI LA PROCARIOTE

Biosinteza ARN-ului prezintă asemănări și deosebiri față de biosinteza ADN-ului. Asemănările sînt: a) direcția de sinteză este $5' \rightarrow 3'$ (antiparalelă lanțului matrice de ADN); b) reacția de alungire a lanțului de ARN este similară, deoarece se folosesc nucleozidtrifosfați și se eliberează acid pirofosforic; ulterior acesta hidrolizează cu eliberare de energie (fig. 10.5.).

Reacția este catalizată de către ARN-polimeraza ADN-dependentă numită și transcriptază. Enzima necesită trei componente pentru a sintetiza ARN: a) matrice de ADN dublu elicoidal; b) precursori activați (ribonucleozid trifosfați); ATP, GTP, UTP și CTP; c) cationi bivalenți în special Mg^{2+} .

La procariote o singură transcriptază sintetizează atât mRNA, cât și tARN și rARN. Enzima de la *E. coli*, cu greutate moleculară de 500.000 daltoni, este compusă din 5 subunități: două subunități alfa, una beta și una sigma. Subunitățile $\alpha_2\beta\beta'$ se află asociate în permanență formând corpul enzimei, miezul sau enzima minimală. Subunitatea σ este legată reversibil de corp, formându-se astfel holoenzima (fig. 11.3).

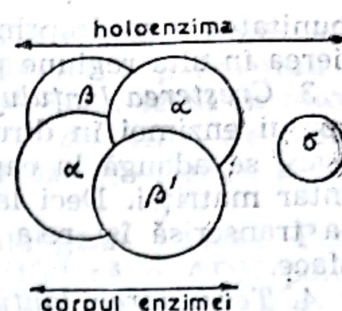


Fig. 11.3. Diagrama structurii ARN polimerazei.

Etapele transcrierii sînt următoarele (fig. 11.4).

1. **Legarea de genă a transcriptazei** se face după ce subunitatea σ s-a asociat de corpul enzimei, deoarece subunitatea σ este cea care poate recunoaște semnalul de unde începe sinteza ARN. Acest semnal este reprezentat de o secvență specifică din ADN numită **promotor**.

2. **Începerea transcrierii** (sau **inițierea**): legarea de genă a transcriptazei duce la desfacerea locală a duplexului de ADN (circa o tură), ceea ce expune matrița, permițînd transcriptazei să lege primele două ribonucleotide printr-o legătură fosfodiesterică. La capătul 5' terminal se află GTP sau ATP. Immediat după începerea polymerizării ARN-ului,

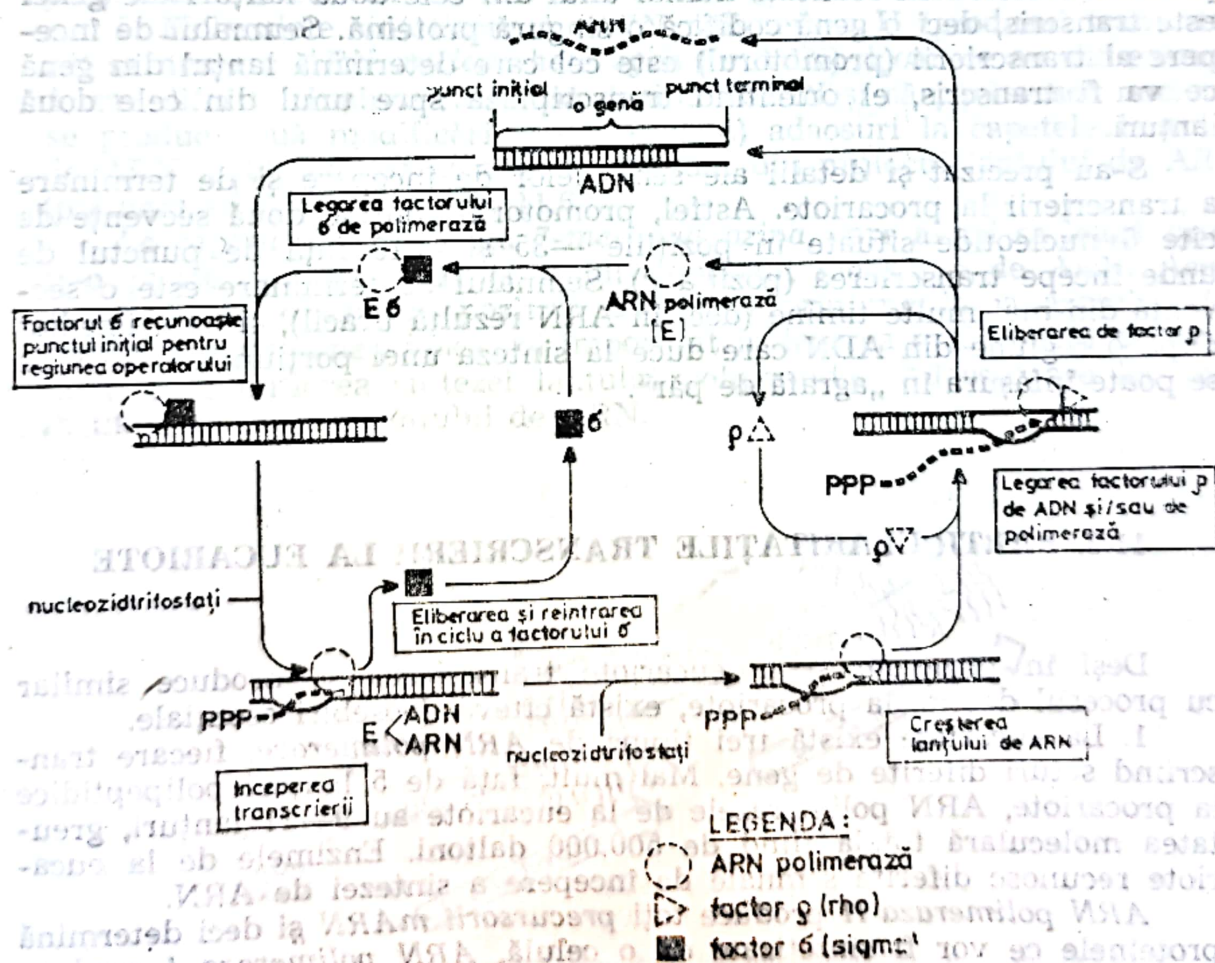


Fig. 11.4. Schema biosintezei ARN-ului.

subunitatea σ se desprinde și se atașează de alt corp spre a începe transcrierea în altă regiune promotoare.

3. **Creșterea lanțului de ARN** (sau *alungirea*) se face prin deplasarea corpului enzimei în direcția $3' \rightarrow 5'$ pe matricea de ADN. La fiecare deplasare se adaugă la capătul $3'$ al lanțului de ARN nucleotidul complementar matriței. Deci lanțul crește în direcția $5' \rightarrow 3'$. Matricea ce a fost deja transcrisă își revine structura elicoidală, iar porțiunea următoare se desface.

4. **Terminarea lanțului de ARN** (sau *oprirea sintezei*) se face prin legarea de ARN polimerază și de genă a unei proteine specifice numită *factorul rho* (ρ), ce recunoaște secvențele de pe ADN ce reprezintă semnalele de terminare. În această situație polimeraza disociază de pe genă și va intra într-un nou ciclu de transcriere, factorul ρ intră în alt ciclu de terminare, gena își recapătă structura inițială, în timp ce ARN-ul este pus în libertate.

5. **Maturarea sau prelucrarea lanțului de ARN**: a) scindarea lanțului în fragmente mai mici; b) metilarea unor grupări OH din riboză sau din bazele purinice și pirimidinice cu ajutorul S-adenozilmetioninei.

Teoretic există posibilitatea ca oricare din cele două lanțuri dintr-o genă să fie copiat în câte o moleculă de ARN. Ar urma să existe pentru o genă două lanțuri de mARN complementare, care ar codifica două proteine diferite. În realitate numai unul din cele două lanțuri ale genei este transcris, deci o genă codifică o singură proteină. Semnalul de începere al transcrierii (promotorul) este cel care determină lanțul din genă ce va fi transcris, el orientând transcriptaza spre unul din cele două lanțuri.

S-au precizat și detalii ale semnalelor de începere și de terminare a transcrierii la procariote. Astfel, promotorul conține două secvențe de câte 6 nucleotide situate în pozițiile -35 și -10 față de punctul de unde începe transcrierea (poziția 0). Semnalul de terminare este o secvență din mai multe timine (deci în ARN rezultă uracil), situată imediat după o regiune din ADN care duce la sinteza unei porțiuni de ARN ce se poate înfășura în „agrafă de păr”.

11.3. PARTICULARITĂȚILE TRANSCRIERII LA EUCARIOTE

Deși în principiu și la eucariote transcrierea se produce similar cu procesul descris la procariote, există câteva deosebiri esențiale.

1. La eucariote există trei tipuri de ARN polimeraze, fiecare transcriind seturi diferite de gene. Mai mult, față de 5 lanțuri polipeptidice la procariote, ARN polimerazele de la eucariote au 9—11 lanțuri, greutatea moleculară totală fiind de 500.000 daltoni. Enzimele de la eucariote recunosc diferite semnale de începere a sintezei de ARN.

ARN polimeraza II produce toți precursorii mARN și deci determină proteinele ce vor fi sintetizate de o celulă, ARN polimeraza I produce speciile de rARN mari, iar ARN polimeraza III sintetizează tARN-ul și

ARN 5S. Într-o celulă eucariotă evoluată există cîte 40.000 molecule de ARN polimerază II și circa 20.000 molecule de ARN polimerază III.

2. La eucariote transcrierea se produce pe ADN-ul legat în nucleozomi, deci fără disocierea miezului nucleozomului de ADN. Se pare că și pe fibra de cromatină de 30 nm ARN polimeraza își găsește acces la ADN pentru a realiza transcrierea.

3. Frecvența cu care sînt transcrise diferite gene variază. Pentru majoritatea genelor transcrierea se face rar, astfel că o ADN polimerază II parcurge întreaga genă înainte ca o altă transcriptază să se lege de genă. În schimb, pe alte gene transcrise cu frecvență mare, se pot lega simultan mai multe transcriptaze. Pe măsură ce acestea se deplasează de la semnalul de inițiere spre semnalul de terminare, lanțul de ARN legat de genă este mai lung. Ansamblul format de porțiunea de cromatină aflată în transcriere și moleculele de ARN atașate de genă poartă numele de *unitate de transcriere* și se poate vedea la microscopul electronic sub forma unei imagini ca o frunză de ferigă (fig. 11.5.).

4. ARN-ul nou sintetizat este imediat împachetat, prin legarea de el a unor proteine cu greutate moleculară de 30.000—40.000 daltoni (aceste proteine fiind printre cele mai abundente în nucleu). Se realizează astfel *complexe ribonucleoproteice* globulare (care la microscopul electronic seamănă cu nucleozomii) înșirate, ca niște mărgelile pe o ață, pe produsul transcrierii.

5. Moleculele sintetizate de ARN polimeraza II (produsul transcrierii) se numesc *ARN nuclear heterogen* (hnARN) deoarece au dimensiuni foarte diferite. Înainte ca ele să devină mARN și să părăsească nucleul, se produc două modificări importante: a) adaosuri la capetele lanțului de ARN și b) îndepărtarea unor porțiuni din mijlocul lanțului de ARN (prelucrarea ARN-ului) (fig. 11.6.).

La capătul 5' se adaugă *7-metilguanozina*, care astfel se leagă printr-o punte din trei grupări fosfat de restul moleculei de ARN. Acest „cap“ 5', cu o sarcină pozitivă dobîndită prin metilarea azotului din poziția 7 a guaninei, joacă rol important în legarea mARN-ului de ribozom și în inițierea sintezei lanțului polipeptidic. Adaosul are loc încă în timpul elongării lanțului de ARN.

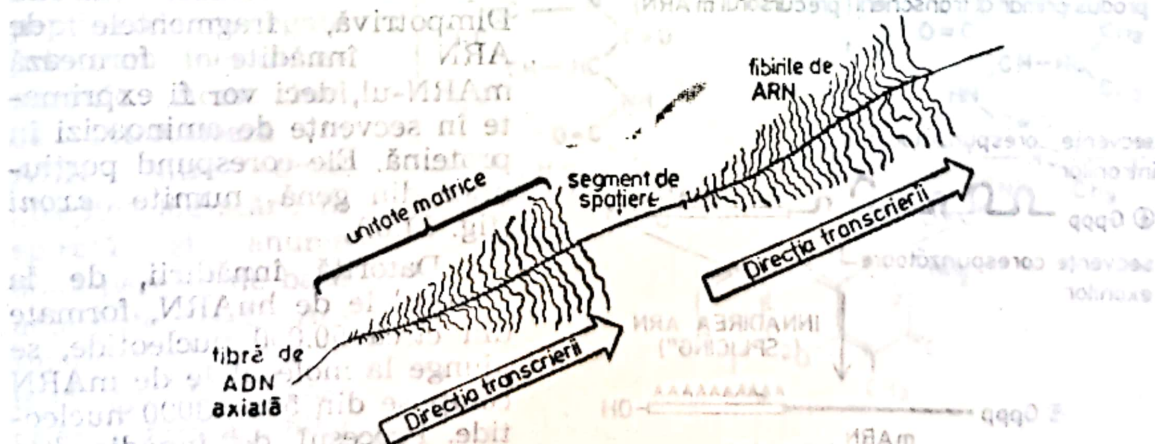


Fig. 11.5. Diagrama transcrierii simultane a unei gene de mai multe ARN polimeraze.

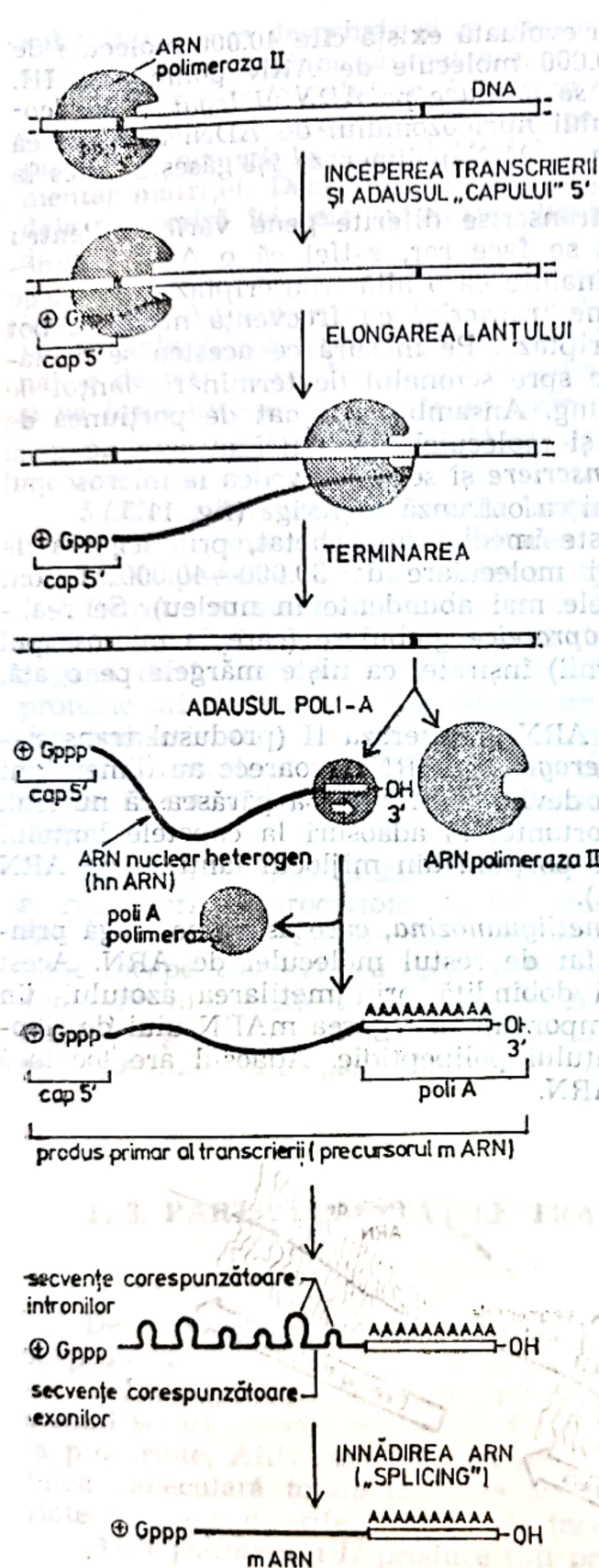


Fig. 11.6. Diagrama modificărilor ARN-ului pentru a deveni mARN.

La capătul 3' se adaugă 100—200 resturi de acid adenilic (poli A), prin acțiunea enzimei poli A polimerază. Probabil că poli A ajută la prelucrarea ARN-ului și la exportul său din nucleu.

După ce a suferit modificări la capete, lanțul de ARN poartă numele de *produs primar al transcrierii* („primary RNA transcript”) sau *precursorul mARN*.

6. *Prelucrarea precursorului mARN* este o diferență esențială între procariote și eucariote. La procariote molecula de ARN produs al transcrierii este în întregime tradusă în secvență de aminoacizi în lanțul polipeptidic. În schimb la eucariote precursorul mARN-ului este astfel prelucrat încât se îndepărtează din mijlocul moleculei mai multe porțiuni, iar zonele rămase sînt sudate la capete. Procesul se numește *înnădirea ARN-ului* („*splicing*”). Porțiunile din ARN care sînt îndepărtate nu mai ajung în mARN, deci nu vor fi exprimate în secvențe de aminoacizi în proteina codificată de genă. Porțiunile din genă care nu se exprimă se numesc *introni*. Dimpotrivă, fragmentele de ARN înnădite formează mARN-ul, deci vor fi exprimate în secvențe de aminoacizi în proteină. Ele corespund porțiunilor din genă numite *exoni* (fig. 11.6.).

Datorită înnădirii, de la moleculele de hnARN, formate din circa 50.000 nucleotide, se ajunge la moleculele de mARN compuse din 500—3000 nucleotide. Procesul de înnădire se produce în circa 30 min după terminarea transcrierii și pro-

babii că învelișul nuclear la eucariote are funcția de a împiedica ieșirea hnARN.

Într-o celulă animală tipică 7—10% din totalul ADN nuclear este transcris, dar după înădărire rămâne doar 1—2% din totalul ADN care va fi tradus în proteine.

În realizarea procesului de înădărire par a juca rol important *particulele ribonucleoproteice nucleare mici* („small nuclear ribonucleoprotein particles”, snRNP), care seamănă ca structură cu ribozomii, având mai multe lanțuri polipeptidice complexate cu o moleculă de ARN. Au greutate moleculară de circa 250.000 daltoni, față de ribozom ce are 4,5 milioane daltoni: snRNP asigură excizia precisă a segmentelor pentru a nu se modifica mesajul genetic (vezi și cap. 12.).

Pe lângă snRNP mai există și alte particule ribonucleoproteice care ghidează în mod specific moleculele de ARN la ieșirea din nucleu sau ajută în asamblarea ribozomilor.

11.4. INHIBITORII TRANSCRIERII: ANTIBIOTICELE RIFAMICINĂ ȘI ACTINOMICINĂ

Există două antibiotice care inhibă specific transcrierea. *Rifamicina* (extrasă din *Streptomyces*) și *rifampicina* (derivat semisintetic) inhibă inițierea sintezei mARN-ului la bacterii: acționând asupra subunității beta din transcriptază, inhibă formarea primei legături fosfodiesterice.

Actinomicina D (fig. 11.7.) are în structura sa două peptide ciclice legate printr-un inel fenoxazonic. Acest inel se intercalează în ADN între două „trepte” ale scării în spirală și anume două perechi de baze adiacente G—C. Actinomicina inhibă în mod specific transcrierea, fără a inhiba replicarea sau biosinteza proteinelor.

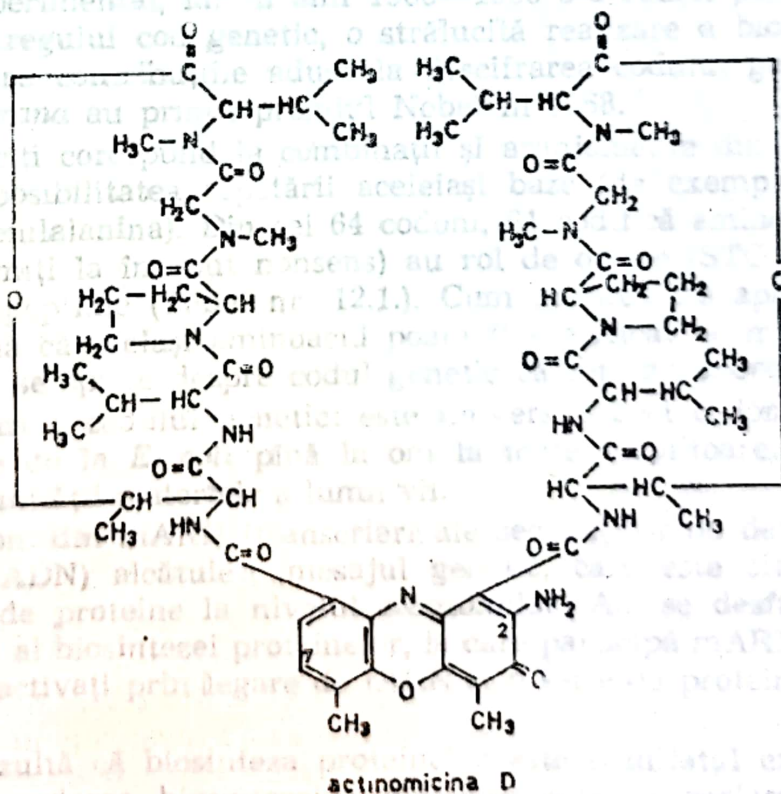


Fig. 11.7. Formula actinomicinei D.

12. TRADUCEREA CODULUI GENETIC ÎN BIOSINTEZA PROTEINELOR

După cum s-a spus în cap. 8, „dogma centrală” a biologiei moleculare afirmă că mesajul genetic stocat sub forma secvenței de baze în ADN este copiat, transcris, într-o secvență de baze în mRNA și este apoi tradus în secvență de aminoacizi în proteine. Dar în acizii nucleici există 4 baze diferite, pe când în proteine circa 20 aminoacizi diferiți. Deci de la un limbaj de 4 litere trebuie trecut la un limbaj de 20 litere. Pentru ca 4 baze diferite să poată specifica 20 aminoacizi diferiți este nevoie de un cod. Acest *cod genetic* este relația dintre secvența bazelor în ADN (sau în mRNA) și secvența aminoacizilor în proteine. Cuvintele codului genetic sînt numite *codoni*; fiecare codon este format din 3 nucleotide (sau baze) și specifică un aminoacid (adică determină legarea unui anumit aminoacid în lanțul polipeptidic). Deci codul genetic este *triplet*. Acest lucru, sugerat întîi de Gamow pe considerente teoretice, a fost apoi dovedit experimental, iar în anii 1960—1966 s-a reușit performanța descifrării întregului cod genetic, o strălucită realizare a biologiei moleculare. Pentru contribuțiile aduse la descifrarea codului genetic Nirenberg și Khorana au primit premiul Nobel în 1968.

Există 64 codoni, cîți corespund la combinații și aranjamente din 4 baze luate cîte 3 cu posibilitatea repetării aceleiași baze (de exemplu U—U—U specifică fenilalanina). Din cei 64 codoni, 61 codifică aminoacizi, iar 3 codoni (numiți la început nonsens) au rol de oprire (STOP) a sintezei lanțului polipeptidic (Tabel nr. 12.1.). Cum în proteine apar 20 aminoacizi, înseamnă că același aminoacid poate fi specificat de mai mulți codoni. De aceea se spune despre codul genetic că este *degenerat*.

O altă caracteristică a codului genetic: este universal, deci codonii au aceeași semnificație de la *E. coli* pînă la om la toate viețuitoarele. Este încă un aspect al unității materiale a lumii vii.

Secvențele de codoni din mRNA (transcrieri ale secvențelor de dezoxiribonucleotide din ADN) alcătuiesc mesajul genetic, care este citit și tradus în secvențe de proteine la nivelul ribozomilor. Aci se desfășoară procesul complex al biosintezei proteinelor, la care participă mRNA, ribozomii, aminoacizii activați prin legare de tARN și o serie de proteine solubile.

Din cele spuse rezultă că biosinteza proteinelor este rezultatul exprimării genelor, iar reglarea biosintezei proteinelor este și reglarea exprimării genelor. De aceea, dată fiind complexitatea problemelor, în

Tabel nr. 12.1. Codul genetic „universal”^{a)}

Prima poziție (capătul 5')	A doua poziție				A treia poziție (capătul 3')
	U	C	A	G	
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G
C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

a) Fiecare set de trei baze nucleotidice din ARN (deci fiecare codon) este tradus într-un aminoacid legat în lanțul polipeptidic în cursul biosintezei proteinelor. De pildă codonul GUG este tradus în valină, GAG în acid glutamic etc. Prescurtările aminoacizilor sînt următoarele: Phe = fenilalanină, Ser = serină, Tyr = tirozină, Cys = cisteină, Leu = leucină, Trp = triptofan, Pro = prolină, His = histidină, Arg = arginină, Gln = glutamină, Ile = izoleucină, Thr = treonină, Asn = asparagină, Lys = lizină, Val = valină, Ala = alanină, Glu = acid glutamic, Gly = glicocol.

acest capitol se descriu aspectele moleculare ale biosintezei proteinelor, iar reglarea acestui proces va fi descrisă, separat pentru procariote și eucariote în cap. 13 și 16.

12.1. RIBOZOMII: SEDIUL BIOSINTEZEI PROTEINELOR

Ribozomii au rol esențial în coordonarea traducerii codului genetic, interacționînd cu mARN și cu celelalte molecule necesare în biosinteza proteinelor. În ribozomi se realizează legarea aminoacizilor în lanțul polipeptidic, deci ribozomii sînt „uzinele” de fabricare a proteinelor celulei. Ribozomii sînt organite prezente în toate celulele în foarte multe exemplare. La eucariote pot fi liberi în citoplasmă ori atașați reticulului endo-

plasmic (aceștia din urmă au fost numiți multă vreme „granulațiile lui Palade”, după numele savantului de origine română *George Palade*).

La microscopul electronic ribozomii se prezintă sub formă de grănule cu dimensiunea de 20/30 nm cărora nu li se pot distinge detaliile de structură.

Ribozomii sînt formați din două subunități: una mai mare și alta mai mică. *Ribozomul bacterian* are o masă de circa $2,4 \times 10^6$ daltoni și este numit 70S, după viteza cu care sedimentează cînd este centrifugat (constanta de sedimentare, măsurată în unități Svedberg). Cele două subunități sînt numite 50S (subunitatea mare) și 30S (subunitatea mică), tot după constantele de sedimentare.

Ribozomii eucariotelor aflați în mitocondrii și cloroplaste sînt foarte asemănători ribozomilor bacterieni, fiind tot de tipul 70S. În schimb, ribozomii din citoplasma celulelor eucariote sînt mai mari, de 80S, fiind formați dintr-o subunitate 60S și una 40S. Deci prototipul ribozomului eucariotic este cel 80S.

Ribozomii bacterieni, de pildă la *E. coli*, au subunitatea mică 30S compusă dintr-un singur fel de ARN, numit ARN 16S și din 21 proteine distincte. Subunitatea mare 50S este compusă din două tipuri de ARN (5S și 23S) plus 34 proteine diferite.

În cazul ribozomilor eucariotici subunitatea mare 60S conține trei specii de ARN (5S; 5,8S și 28S), iar subunitatea mică 40S conține ARN 18S, numărul de proteine fiind cel indicat în fig. 12.1.

O proprietate remarcabilă a ribozomilor este faptul că aceste structuri se autoasamblează. *Autoasamblarea* în biologia moleculară este procesul prin care componentele izolate dintr-un complex specific se asociază în mod spontan în anumite condiții pentru a reconstitui complexul cu structura inițială și cu aceleași funcții. În cazul ribozomilor, *Nomura* în 1968 a demonstrat că dacă se pun în contact moleculele de ARN 16S cu cele 21 proteine ribozomale din subunitatea mică, se reface în mod

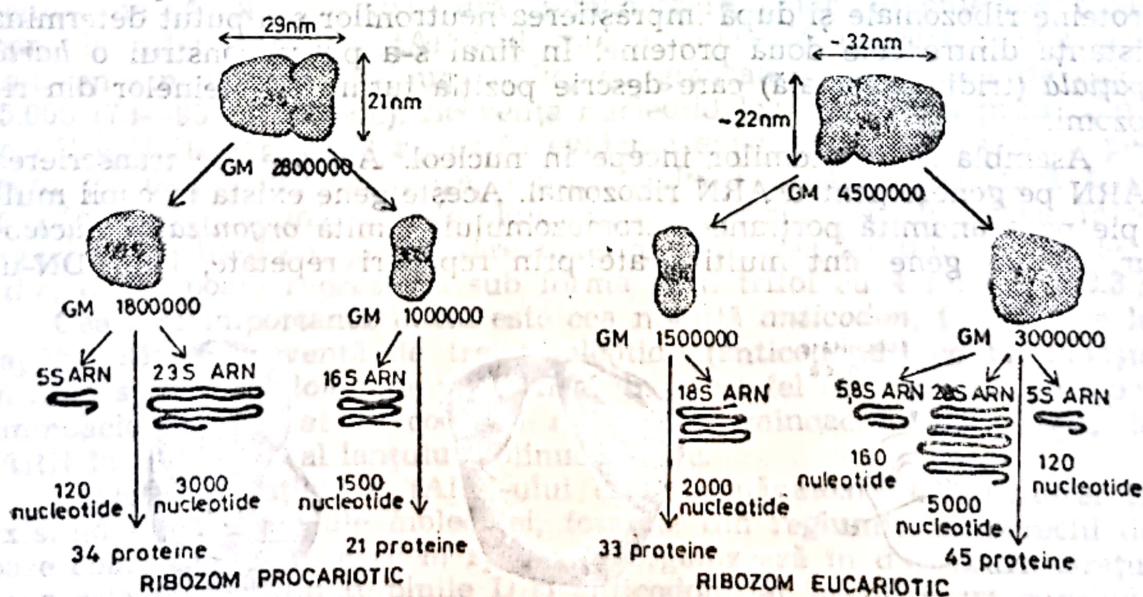


Fig. 12.1. Diagrama componentelor ribozomilor 70S și 80S.

spontan structura subunității mici. După câțiva ani s-a reușit și reconstituirea subunității 50S. Aceste subunități reconstituite sînt la fel de active în biosinteza proteinelor ca și cele inițiale. Reconstituirea ribozomilor din componente izolate demonstrează că formarea ribozomilor *in vitro* și probabil și *in vivo* este un proces de autoasamblare. Informația necesară pentru formarea ribozomilor este conținută în componentele sale, nefiind necesari factori neribozomali. Pe lângă aceasta s-a putut determina rolul componentelor în asamblarea ribozomilor: rARN este esențial, în schimb unele din proteinele ribozomale se pot exclude și totuși asamblarea subunității se produce.

Toate speciile de ARN ribozomal provin dintr-un precursor comun, care, după ce a fost sintetizat pe matrița de ADN, este scindat. Astfel, la procariote un precursor de 45S (sintetizat de ARN polimeraza I) este scindat în rARN 5,8S, 18S și 28S. rARN 5S este sintetizat de ARN polimeraza III.

Pe lângă rolul important pe care îl are în asamblarea proteinelor ribozomale, rARN-ul joacă rol crucial în procesul de recunoaștere ribozom—mARN—tARN prin faptul că poate forma perechi de baze complementare cu anumite regiuni din tARN și mARN. Dar rARN-ul nu poartă informație genetică, rolul de matriță în biosinteza proteinelor revenind mARN-ului. S-a putut determina aranjarea spațială a tuturor proteinelor ribozomale în ribozomi cît și dimensiunile și forma spațială a ribozomilor. Ei au structură asimetrică cu diametrul mic de circa 20 nm și cel mare de 30 nm. Subunitatea mare posedă o adîncitură în formă de șa, în care se află subunitatea mică, alungită, reniformă (fig. 12.2).

Organizarea moleculară a ribozomilor a fost elucidată prin două tehnici diferite. Pe de o parte o tehnică imunologică: dacă se induce formarea de anticorpi față de o anumită proteină ribozomală, cînd acești anticorpi se leagă de ribozomi se formează complexe ce pot fi examinate prin microscopie electronică. Pe de altă parte, s-a folosit o tehnică fizică, împrăștierea neutronilor. S-au marcat cu deuteriu perechi de proteine ribozomale și după împrăștierea neutronilor s-a putut determina distanța dintre cele două proteine. În final s-a putut construi o hartă spațială (tridimensională) care descrie poziția tuturor proteinelor din ribozomi.

Asamblarea ribozomilor începe în nucleol. Aci are loc transcrierea rARN pe genele pentru ARN ribozomal. Aceste gene există în copii multiple pe o anumită porțiune a cromozomului numită *organizator nucleolar*. Aceste gene sînt multiplicare prin replicări repetate, iar ADN-ul

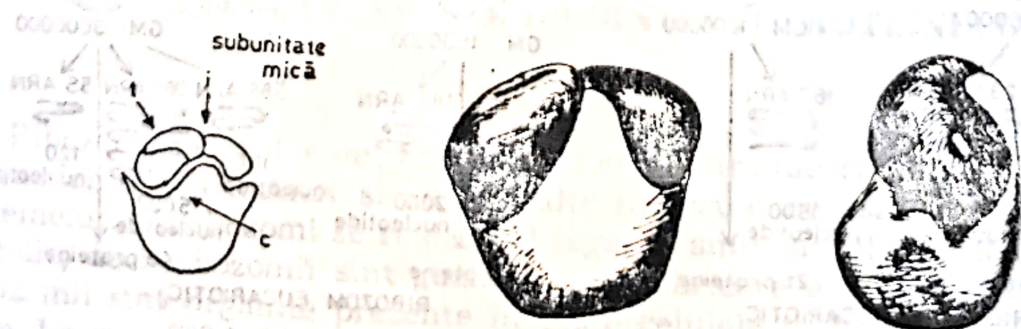


Fig. 12.2. Structura spațială a ribozomului.

extracromozomial ce rezultă prin această replicare intră în structura nucleolului. Pe acest ADN are loc transcrierea rARN, care poate fi văzută la microscopul electronic: pe filamentul central de ADN se observă ramificații laterale de rARN din ce în ce mai lungi, pe măsură ce ARN polimeraza (transcriptaza) se deplasează în lungul genei (aspectul general este cel al unei frunze de ferigă). Imediat după sinteză rARN este îmbrăcat în proteină formînd precursorii ribozomali, care dau aspectul granular al cortexului nucleolului. Acești precursori trec apoi în citoplasmă unde vor forma ribozomii.

12.2. ARN DE TRANSFER: MOLECULE ADAPTOR, DE RACORDARE A AMINOACIZILOR PE mARN, ÎN BIOSINTEZA PROTEINELOR

Crick a fost primul care a sugerat că aminoacizii nu se pot lega direct pe mARN, fiindcă bazele purinice și pirimidinice nu pot oferi locuri specifice de legare pentru 20 de aminoacizi foarte diferiți. El a sugerat că trebuie să intervină o moleculă adaptor, care să lege pe de o parte în mod specific cîte un aminoacid, iar pe de altă parte să se lege de mARN. Aceste molecule de racordare s-au dovedit a fi tot specii de ARN, numite *ARN de transfer* (tARN).

Există un mare număr de tipuri de tARN specifice pentru diferiți aminoacizi. Chiar pentru același aminoacid pot exista mai multe molecule diferite de tARN (aceasta este și în legătură cu degenerarea codului genetic). La eucariote moleculele de tARN din mitocondrii pot fi diferite de cele din citoplasmă chiar dacă transportă același aminoacid.

Indiferent de tipul de aminoacid transportat și de specie toate moleculele de tARN au o structură asemănătoare, chiar secvențe asemănătoare la diferite specii. tARN-ul este o *moleculă universală*, formată dintr-un singur lanț polinucleotidic, cu greutatea moleculară de circa 25.000 (73—93 nucleotide). Secvența nucleotidelor (descifrată prima dată de către Holley în 1955) a pus în evidență existența a 4 regiuni cu perechi de baze complementare, numite *tulpini*, și 4 regiuni fără baze complementare numite *bucle*. Formarea legăturilor de hidrogen între perechile de baze complementare determină plierea lanțului polinucleotidic, ce se poate reprezenta sub forma unui trifoie cu 4 foi (fig. 12.3.).

Cea mai importantă buclă este cea numită *anticodon*, fiindcă are la capătul său o secvență de trei nucleotide (anticodonul) ce recunoaște în mod specific *codonul* de pe mARN. În acest fel este adus la ribozom aminoacidul codificat de codonul respectiv. Aminoacidul este legat de tARN la capătul 3' al lanțului polinucleotidic.

Structura spațială a tARN-ului este asemănătoare cu a literei L, existînd două brațe ale moleculei, formate din regiunile cu perechi de baze complementare, care în spațiu se organizează în duplexuri. Brațul lung este format din tulpinile D și anticodon, iar brațul scurt cuprinde tulpinile T și acceptor (fig. 12.4.). În zona dintre cele două brațe se află

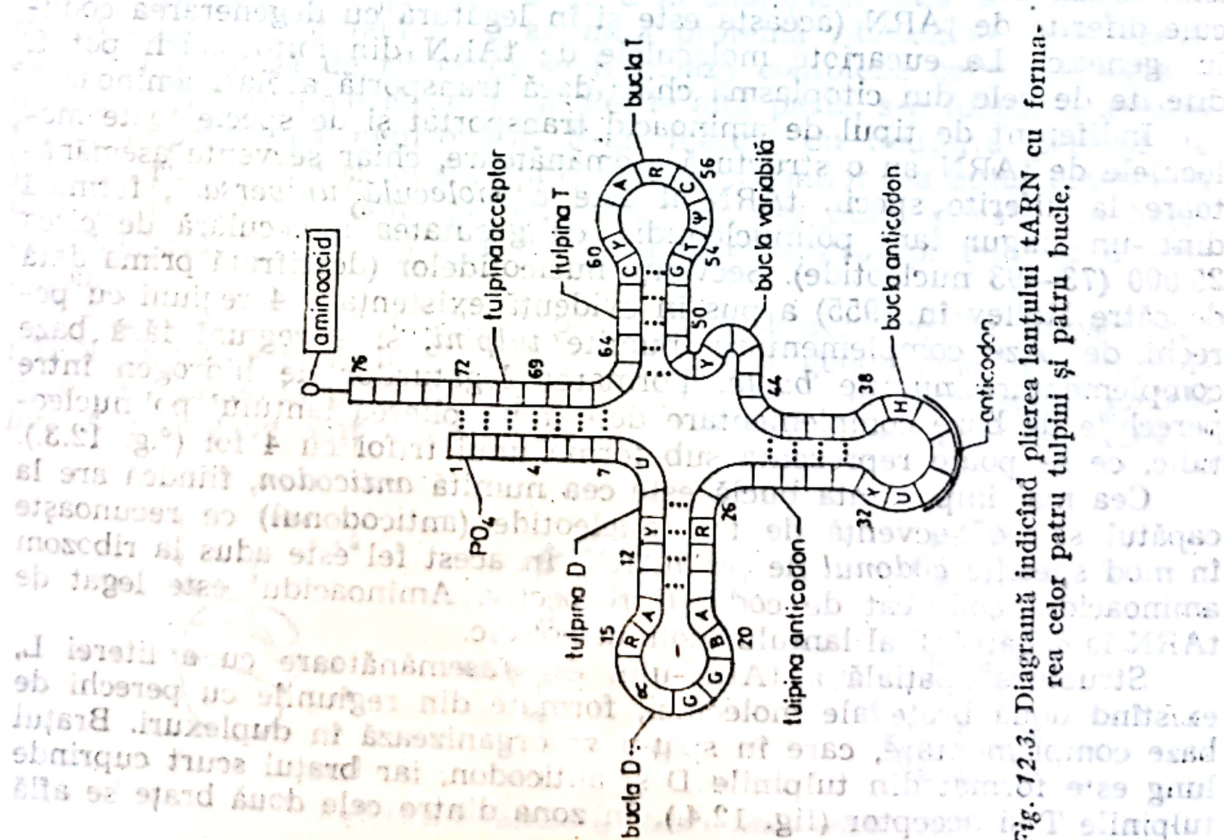


Fig. 12.3. Diagramă indicând plierea lanțului tARN cu formarea celor patru tulpini și patru bucle.

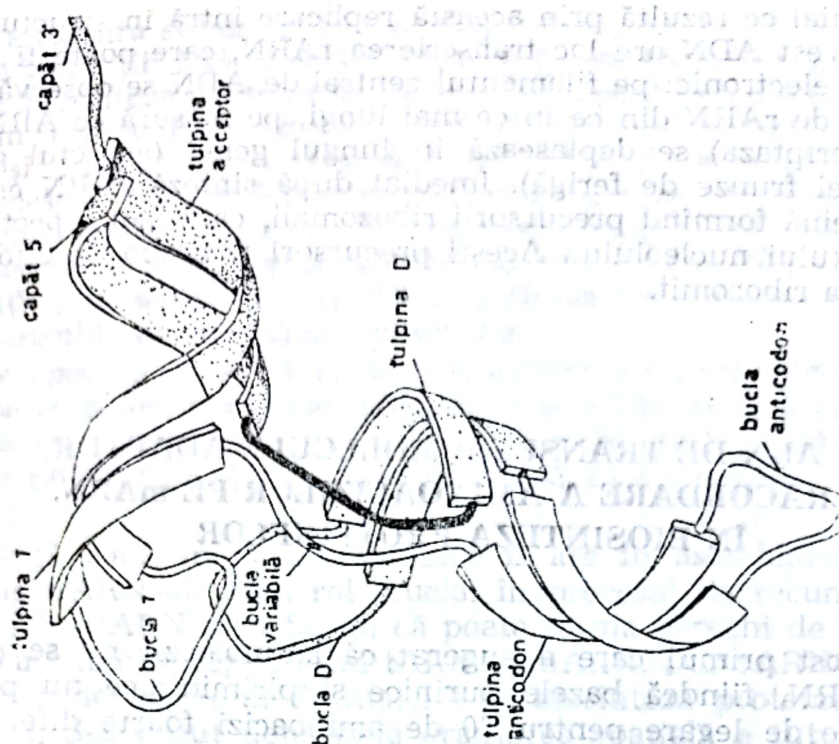
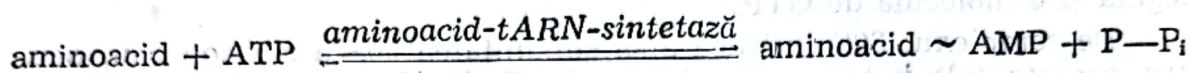


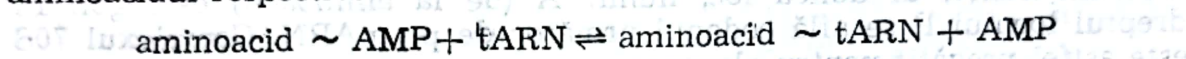
Fig. 12.4. Structura tridimensională a tARN-ului.

un fel de „articulație” ce permite mișcări necesare în cursul transferului aminoacidului pe lanțul polipeptidic în ribozom. Totodată regiunile de duplex conferă moleculei o mare stabilitate, în timp ce situarea la distanță a aminoacidului de anticodon permite legarea de tARN a oricărui tip de aminoacid și în același timp nu este „jenată” interacțiunea codon-anticodon de tipul aminoacidului. Prin aceste caracteristici molecula de tARN este perfect adaptată funcției sale (principiul biologiei moleculare). tARN-ul ilustrează încă o dată principiul unității materiale a lumii vii.

Legarea aminoacidului de tARN este catalizată de o enzimă numită *aminoacid-tARN-sintetază*, ce catalizează două reacții succesive. În prima, aminoacidul este activat prin legare de AMP:



Aceeași enzimă transferă apoi aminoacidul pe tARN la ciocnirea produsului aminoacid $\sim$ AMP cu o moleculă de tARN specifică pentru aminoacidul respectiv:



Echilibrul reacțiilor este deplasat spre dreapta datorită hidrolizei acidului pirofosforic (P-P_i) format în prima reacție.

De remarcat că aminoacidul este legat prin gruparea carbonil de tARN prin legătură macroergică. La formarea legăturii peptidice se folosește această energie, fiindcă aminoacidul se desprinde de tARN spre a forma legătura peptidică. Complexul aminoacid-tARN se numește *tARN încărcat*. După ce acesta transportă aminoacidul la ribozom și se formează legătura peptidică, tARN-ul și-a îndeplinit funcția, se descarcă și se desparte de ribozom.

Există câte o aminoacid-tARN-sintetază pentru fiecare aminoacid, dar aceeași enzimă poate lega aminoacidul de tARN diferiți.

La eucariote aminoacid-tARN sintetazele există sub forma unor complexe cu activități sintetazice multiple, ce conțin și alte componente (Deutcher, 1984).

12.3. MECANISMUL MOLECULAR AL BIOSINTEZEI PROTEINELOR ÎN RIBOZOMI

Lanțul polipeptidic este sintetizat în ribozomi în direcția amino $\rightarrow$ carboxil. În afara perioadelor când sînt angajați în sinteza unei proteine, ribozomii se află disociați în subunități. Asocierea celor două subunități, deci formarea ribozomului funcțional, se produce numai când începe sinteza lanțului polipeptidic.

Se disting trei faze ale sintezei proteinelor, mai bine cunoscute la procariote, dar mecanismul de bază este universal.

1. *Faza de inițiere* la procariote începe cu formarea formilmetionil-tARN-ului. În prima reacție (catalizată de aminoacid-tARN-sintetază)

metionina este legată de un tARN specific ($tARN_f$); în a doua reacție (catalizată de transformilază), grupa amino este blocată prin formilare (fig. 12.5).

Urmează apoi formarea complexului de inițiere 30S (fig. 12.6.) care se face cu participarea unor proteine solubile din citosol, numite factori de inițiere (IF1, IF2, IF3). Formilmationil-tARN-ul se leagă de subunitatea 30S a ribozomului (legarea fiind accentuată de factorul IF2), după care se leagă de mRNA (în aceasta factorul IF3 are rol important). În formarea complexului 30S joacă rol important recunoașterea de către tARN-ul de inițiere (al metioninei) a unui loc specific pe mRNA, situat la circa 10 nucleotide de la capătul 5' al mRNA. În complexul 30S mai este legată și o moleculă de GTP.

De complexul 30S se leagă apoi subunitatea 50S a ribozomului, pentru aceasta folosindu-se energia rezultată din hidroliza GTP-ului. S-a format astfel complexul de inițiere 70S, în care pe ribozom există două locuri de legare: un loc, numit P (de la peptidil) este ocupat de formilmationil-tARN; al doilea loc, numit A (de la aminoacil) este gol. În dreptul locului P se află codonul următor de pe mRNA. Complexul 70S este astfel pregătit pentru elongare.

2. Faza de elongare constă din trei timpi (subfaze): inserția unui aminoacid, formarea legăturii peptidice și translocarea.

Inserția constă în legarea pe locul A din ribozom a unui aminoacid-tARN conform codonului al doilea (cel ce se află în dreptul locului A). Acesta este recunoscut de anticodonul ce transportă aminoacidul specificat de cele trei nucleotide ale codonului. Pentru inserție mai sînt necesare: o moleculă de GTP și o proteină solubilă din citosol numită primul factor al elongării (EF_{Tu}). La legarea aminoacil-tARN-ului de locul A se produce hidroliza GTP-ului, iar GDP-ul și factorul EF_{Tu} se desprind de ribozom. Imediat are loc refacerea GTP-ului prin acțiunea celui de al doilea factor al elongării (EF_{Ts}); astfel se reface complexul GTP cu EF_{Tu} pentru a începe o nouă elongare.

În urma inserției s-a format un complex în care pe locul P se află formilmationil-tARN-ul, iar pe locul A se află un aminoacil-tARN. Formarea legăturii peptidice se produce prin transferul formilmationinei (de pe locul P) pe gruparea amino din aminoacil-tARN (deci pe locul A). Reacția este catalizată de enzima peptidiltransferază, ce aparține subunității 50S a ribozomului. Ca urmare a formării legăturii peptidice,

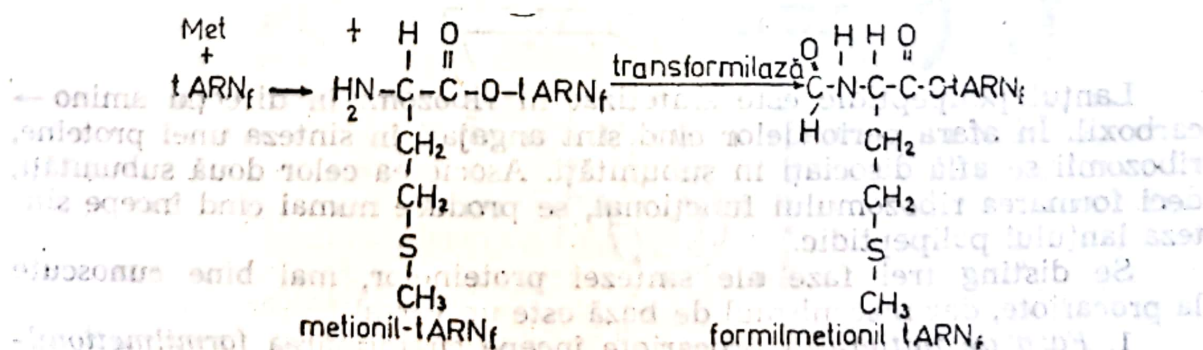


Fig. 12.5. Schema formării formilmationil-tARN-ului.

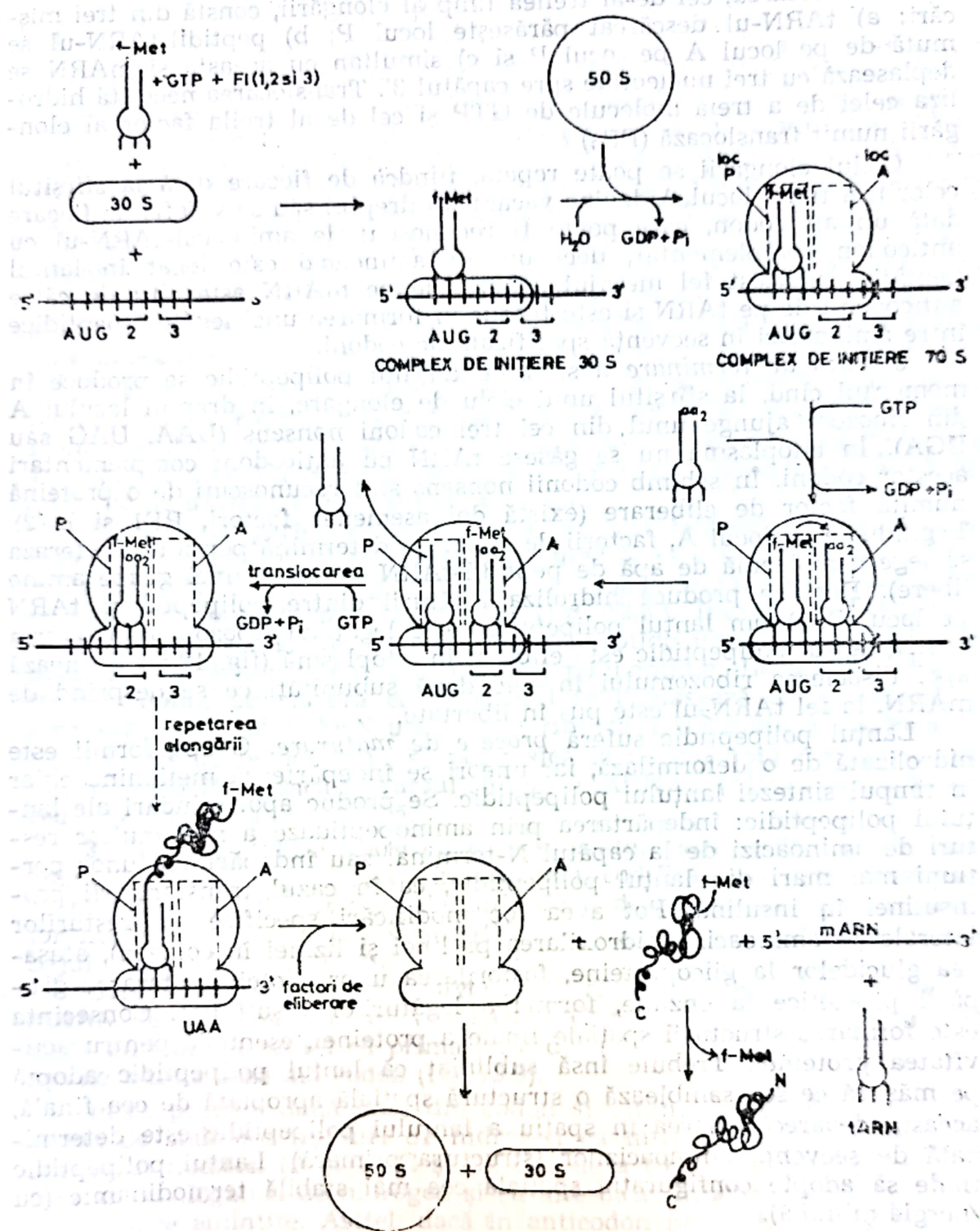


Fig. 12.6. Schema sintezei proteinelor la procariote.

tARN-ul de pe locul A s-a descărcat, în timp ce pe locul A se află un dipeptidil-tARN.

Translocarea, cel de-al treilea timp al elongării, constă din trei mișcări: a) tARN-ul descărcat părăsește locul P; b) peptidil-tARN-ul se mută de pe locul A pe locul P și c) simultan cu aceasta și mARN se deplasează cu trei nucleotide spre capătul 3'. Translocarea necesită hidroliza celei de a treia molecule de GTP și cel de al treilea factor al elongării numit translocază (EF_G).

Ciclul elongării se poate repeta, fiindcă de fiecare dată la sfârșitul celor trei timpi locul A devine vacant. În dreptul său se va afla de fiecare dată un alt codon, care poate fi recunoscut de aminoacil-tARN-ul cu anticodon complementar, deci un alt aminoacid este legat în lanțul peptidic. În acest fel mesajul genetic de pe mARN este citit de către anticodonii de pe tARN și este tradus în formarea unei legături peptidice între aminoacizi în secvența specificată de codoni.

3. *Faza de terminare* a sintezei lanțului polipeptidic se produce în momentul când, la sfârșitul unui ciclu de elongare, în dreptul locului A din ribozom ajunge unul din cei trei codoni nonsens (UAA, UAG sau UGA). În citoplasmă nu se găsesc tARN cu anticodoni complementari acestor codoni. În schimb codonii nonsens sînt recunoscuți de o proteină numită factor de eliberare (există doi asemenea factori, RF1 și RF2). Legîndu-se pe locul A, factorii de eliberare determină peptidiltransferaza să lege o moleculă de apă de peptidil-tARN (în locul unei grupe amino libere). Deci se produce hidroliza legăturii dintre polipeptid și tARN pe locul P. Acum lanțul polipeptidic este legat de ribozom numai prin tARN, lanțul polipeptidic este eliberat în citoplasmă (fig. 12.6.). Urmează apoi disocierea ribozomului în cele două subunități ce se desprind de mARN, la fel tARN-ul este pus în libertate.

Lanțul polipeptidic suferă *proces de maturare*. Grupa formil este hidrolizată de o deformilază, iar uneori se îndepărtează metionina chiar în timpul sintezei lanțului polipeptidic. Se produc apoi scindări ale lanțului polipeptidic: îndepărtarea prin aminopeptidaze a mai multor resturi de aminoacizi de la capătul N-terminal sau îndepărtarea unor porțiuni mai mari din lanțul polipeptidic, ca în cazul transformării proinsulinei în insulină. Pot avea loc modificări specifice ale resturilor laterale de aminoacizi (hidroxilarea prolinei și lizinei în colagen), atașarea glucidelor la glicoproteine, fosforilarea unor proteine, atașarea grupării prostetice la enzime, formarea legăturilor disulfidice. Consecința este formarea structurii spațiale finale a proteinei, esențială pentru activitatea proteinei. Trebuie însă subliniat că lanțul polipeptidic adoptă pe măsură ce se assemblează o structură spațială apropiată de cea finală, aceasta deoarece plierea în spațiu a lanțului polipeptidic este determinată de secvența aminoacizilor (structura primară). Lanțul polipeptidic tinde să adopte configurația spațială cea mai stabilă termodinamic (cu energia minimă).

De menționat că natura lanțului polipeptidic sintetizat de un ribozom este determinată exclusiv de mARN și nu de natura ribozomului. Deci aceiași ribozomi pot sintetiza diferite lanțuri polipeptidice, în funcție de matrița pe care se află legați.

12.4. UNELE PARTICULARITĂȚI ALE BIOSINTEZEI PROTEINELOR

1. În ribozomii 70S din mitocondrii și cloroplaste sinteza proteinelor prezintă asemănări cu cea de la procariote. În schimb *sinteza proteinelor ce are loc în ribozomii 80S* prezintă unele deosebiri. (fig. 12.7.). Astfel, inițierea lanțului polipeptidic are loc prin metionil-tARN care nu este format. Clivarea metioninei are loc mult mai frecvent ca la bacterii (la *E. coli* 45% din proteine au metionina drept aminoacid N-terminal). Apoi, la eucariote factorii proteici solubili (de inițiere, elongare etc.) sînt diferiți. Merită subliniat că la eucariote factorii de inițiere sînt mai numeroși și mai complecși (Thomas și colab., 1981). Mai mult, ei controlează viteza sintezei proteinelor. Astfel inactivarea IF2 (prin fosforilare) duce la scăderea vitezei sintezei proteinelor.

2. *Viteza sintezei proteinelor* este foarte mare: la bacterii în lanțul polipeptidic se leagă 20—40 aminoacizi pe secundă, iar la eucariote circa 1 aminoacid pe secundă (sinteza moleculei de hemoglobină cu toate cele 4 lanțuri polipeptidice durează circa 3 minute). Viteza mare se datorește, pe de o parte, elongării foarte rapide.

Pe de altă parte, viteza mare a sintezei lanțului polipeptidic se datorește și faptului că o moleculă de mARN este tradusă simultan de mai mulți ribozomi. Acest grup de ribozomi legat de o moleculă de mARN se numește *poliribozom* sau *polizom* (fig. 12.8.). Într-un polizom ribozomii așezați la distanțe de circa 100 nucleotide unul de altul, sintetizează fiecare independent cîte un lanț polipeptidic. Lungimea acestuia crește treptat, pe măsură ce ribozomul se deplasează de la capătul 5' spre capătul 3' al mARN-ului, unde ribozomii disociază în subunități.

La procariote polizomii se pot vedea la microscopul electronic asociați cu mARN-ul, încă în cursul sintezei mARN-ului; la eucariote se pot vedea polizomii în citoplasmă.

3. Cu toată viteza mare cu care se sintetizează lanțul polipeptidic, aminoacizii sînt legați strict în secvența codificată de genă, deoarece codonii din mARN sînt citiți de anticodonii de pe tARN. Limbajul bazelor nucleotidice din ADN și mARN, codul genetic, este tradus în limbajul aminoacizilor în lanțul proteinei.

Care sînt regulile care guvernează *recunoașterea unui codon din mARN de către anticodonul din tARN*? Codonul și anticodonul sînt aliniate antiparalel, astfel că prima bază din anticodon este față în față cu cea de a treia bază din codon (fig. 12.9).

Între primele două baze din codon și ultimele două baze din anticodon se stabilesc legături de hidrogen ca între bazele complementare din acizii nucleici (A și U, G și C). Cea de a treia bază din codon poate însă stabili legături de hidrogen și cu alte baze, în afara perechilor complementare amintite. Astfel, dacă în anticodon prima bază este U, acest anticodon poate recunoaște codonul în care a treia bază este A, dar și alt codon în care a treia bază este G. Inozina (I, ce apare frecvent în tARN) poate stabili legături cu A, U, C, dacă este prima bază din anticodon. Prin urmare, există o oarecare libertate sterică, o flexibilitate,

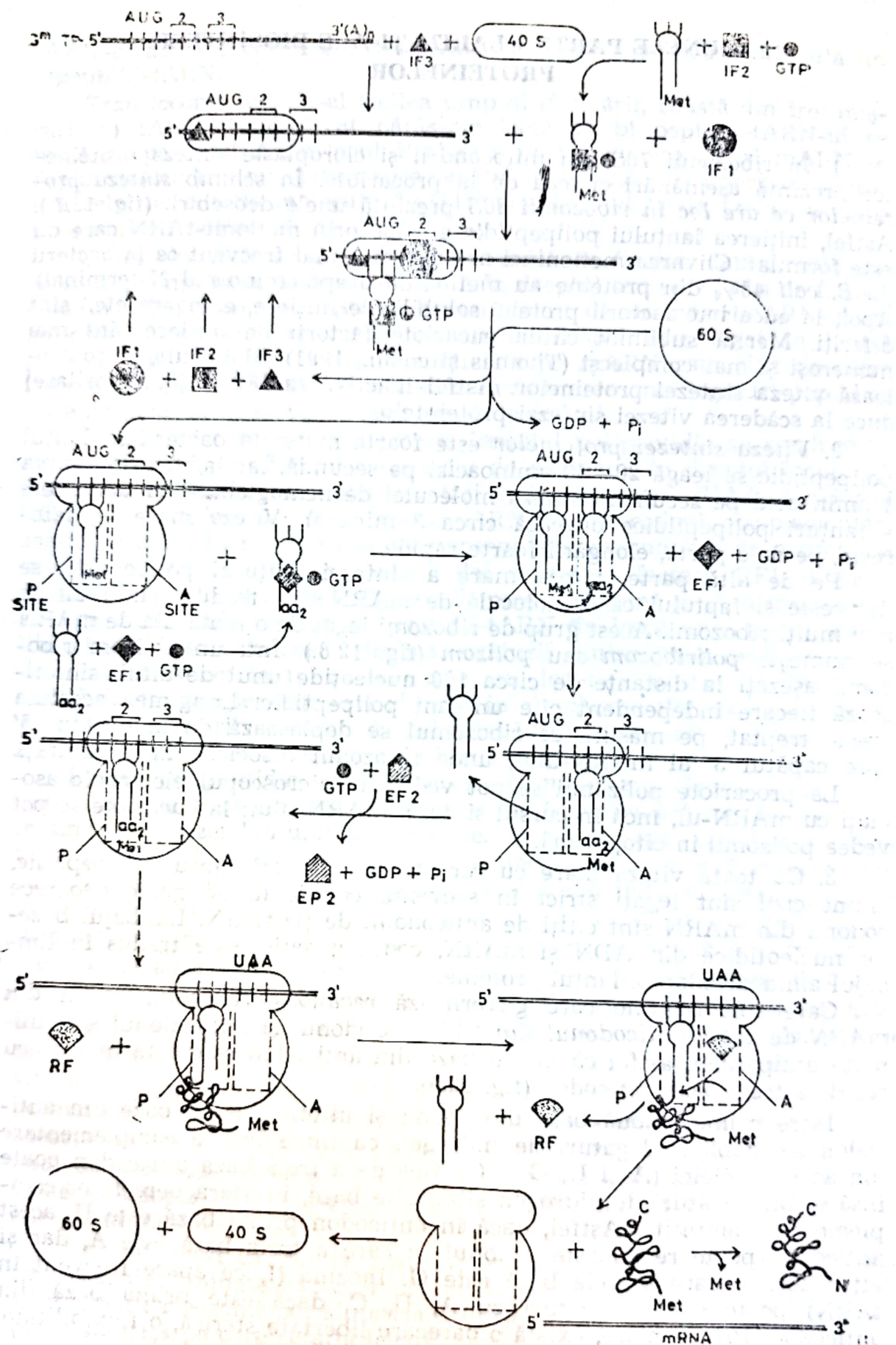


Fig. 12.7. Schema biosintezei proteinelor la eucariote.

la împerecherea celei de-a treia baze din codon (ipoteza „woble”). Consecința este că o anumită moleculă de tARN poate citi unul, doi sau trei codoni diferiți, după cum are prima bază din anticodon C sau A (un codon), U sau G (doi codoni) sau I (trei codoni). Astfel, o parte din degenerarea codului genetic rezultă din imprecizia împerecherii celei de-a treia baze a codonului. Pe de altă parte, codonii care diferă în primele două baze sunt citiți de tARN diferiți. De pildă UUA și CUA, care ambele codifică leucina, sunt citiți de către doi tARN diferiți.

4. Se înțelege de ce prin adăugarea unei baze în plus ori deleția unei baze din mARN apar mutații: din acel punct citirea codonilor este defazată față de mesajul original, fiindcă mARN este citit de la capătul 5' spre capătul 3' în cuvinte de câte trei baze corespunzând codonilor. În cazul mutațiilor de mai sus rezultă alte cuvinte începând cu locul mutației.

5. Numărul de lanțuri polipeptidice care pot fi sintetizate pe o moleculă de mARN este diferit la procariote și eucariote. Astfel, în cazul eucariotelor mARN-ul are la capătul 5' structura compusă din 7-metilguanozină și trifosfat. Se pare că aceasta joacă un rol crucial în recunoașterea semnalului de începere a sintezei lanțului polipeptidic: întotdeauna codonul AUG aflat cel mai aproape de acest „cap” din mARN este recunoscut drept codon de inițiere. Nici un alt codon AUG nu poate servi în acest scop. Deci la eucariote pe fiecare moleculă de mARN se sintetizează un singur lanț polipeptidic.

În schimb la procariote mARN-ul nu are adaosuri la capete, dar posedă mai mulți codoni de inițiere și de terminare pe aceeași moleculă (fig. 12.10.). Aceasta face ca la procariote pe o moleculă de mARN să fie sintetizate mai multe lanțuri polipeptidice. Porțiunea din mARN care codifică un lanț polipeptidic se numește *cistron*. Fiecare cistron începe cu un codon de inițiere (unde se leagă ribozomii) și se termină cu un codon nonsens (aci ribozomii termină sinteza unui lanț polipeptidic, dar la codonul de inițiere următor reîncep sinteza unei alte proteine. Deci mARN la bacterii este de obicei policistronic, pe când la eucariote este întotdeauna monocistronic.

6. Principiul „o genă, un lanț polipeptidic”. Definirea genei ca o regiune a cromozomului (un fragment de ADN)

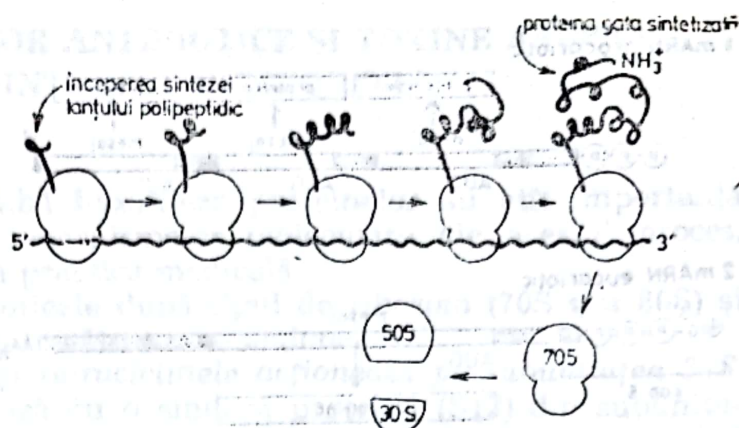


Fig. 12.8. Diagrama polizomului.

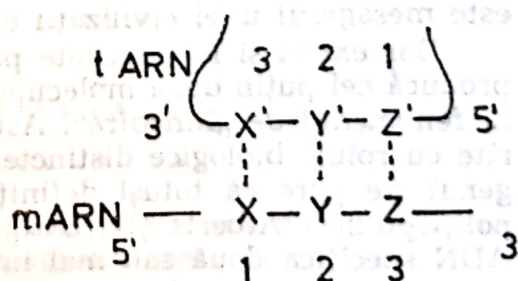
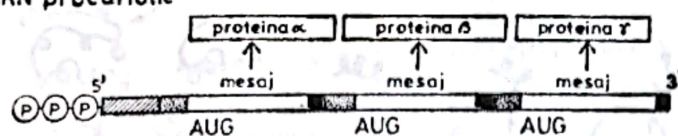
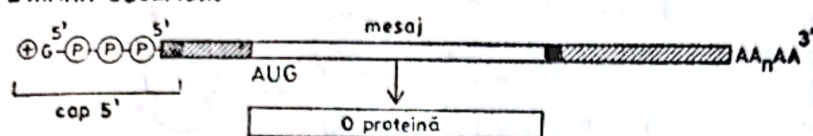


Fig. 12.9. Alinierea codonului cu anticodonul.

1 mARN procariotic



2 mARN eucariotic



- secvențe care nu codifică
- mesaj
- locuri de legare a ribozomilor
- codoni de terminare
- traducerea secvenței ARN în secvență proteică

Fig. 12.10. Comparație între mARN-ul procariotic (cu mai mulți cistroni) și cel eucariotic.

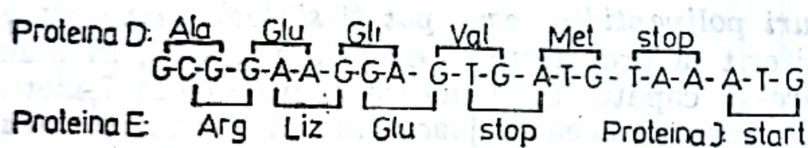


Fig. 12.11. ADN-ul bacteriofagului ϕ X174 cu două polipeptide codificate de aceeași regiune din ADN.

Există apoi și posibilitatea ca un lanț polipeptidic să fie codificat de două gene diferite, cum este cazul lanțurilor polipeptidice din moleculele anticorpilor.

În sfârșit, mai există și posibilitatea ca o genă să codifice două polipeptide. În cazul bacteriofagului ϕ X174 gena pentru o proteină (E) este conținută în gena pentru altă proteină (D), deși cele două proteine sînt neînrudite (fig. 12.11.). S-a emis chiar ipoteza că bacteriofagul ϕ X174 este mesagerul unei civilizații extraterestre cu o tehnologie avansată.

Dar există și la eucariote posibilitatea ca unele secvențe de ADN să producă cel puțin două molecule diferite de mARN, datorită unor variații în fenomenul de „înnădire”. Astfel rezultă cel puțin două proteine diferite cu roluri biologice distincte. În această situație cum trebuie definită gena? Se pare că totuși definiția cea mai bună este „o genă, un lanț polipeptidic” (Alberts și colab., 1983). În cazul cînd aceeași secvență de ADN specifică două sau mai multe polipeptide, se consideră că pe cromozom se suprapun două sau mai multe gene.

De subliniat este și faptul că nu toate genele codifică proteine, așa cum se va vedea în continuare.

care codifică sinteza unui lanț polipeptidic presupune faptul că gena este transcrisă într-o moleculă de mARN și aceasta este tradusă într-un lanț polipeptidic (conform „dogmei centrale a biologiei moleculare”). Acest principiu, deși în general valabil (Alberts și colab., 1983), trebuie completat cu mai multe variante. Una este cea de mai sus, referitoare la existența mai multor cistroni într-o moleculă de mARN la bacterii (deci s-ar putea spune „un cistron, un lanț polipeptidic”).

A doua completare se referă la eucariote, unde genele sînt de mai multe ori discontinue, avînd introni și exoni, (vezi cap. 11).

12.5. EFECTELE UNOR ANTIBIOTICE ȘI TOXINE ASUPRA BIOSINTEZEI PROTEINELOR

Antibioticele care inhibă biosinteza proteinelor au atît importanță fundamentală, în studiul mecanismelor moleculare ale acestui proces, cît și o mare importanță în practica medicală.

Se pot clasifica antibioticele după tipul de ribozom (70S sau 80S) și după subunitatea (mare sau mică) pe care acționează.

Astfel, *streptomicina* și *tetraciclinele* acționează pe subunitatea 30S. Streptomicina interacționează cu o singură proteină (S12) din subunitatea 30S producînd citirea greșită a mRNA-ului. Mutațiile în proteina S12 duc la pierderea sensibilității bacteriilor la streptomicină. Tetraciclinele blochează legarea aminoacil-tARN-ului pe locul A din ribozomi.

Cloramfenicolul și *cicloheximida* acționează pe subunitatea mare a ribozomului, inhibînd activitatea peptidiltransferazei. Dar cloramfenicolul acționează pe subunitatea 50S a ribozomilor 70S de la bacterii, sau din mitocondrii și cloroplaste, pe cînd cicloheximida este activă pe subunitatea 60S a ribozomilor eucariotici. Cele două antibiotice se și folosesc spre a diferenția ribozomii 70S și 80S.

Pe subunitatea mare (50S) a ribozomului procariotic acționează eritromicina împiedicînd translocarea.

În schimb *puromicina* acționează pe ambele tipuri de ribozomi producînd terminarea prematură a sintezei lanțului polipeptidic. Puromicina „înșală” ribozomul, deoarece avînd structură asemănătoare cu aminoacil-tARN-ul se leagă de locul A din ribozomi. Puromicina are și o grupare NH_2 liberă, care formează cu gruparea carboxil a restului peptidil (aflat pe locul P) o legătură peptidică. După aceea peptidilpuromicina părăsește ribozomul. Din experiențe cu puromicină, s-a născut ideea celor două locuri, A și P, din ribozom: cînd peptidil-tARN-ul este pe locul A, deci înainte de translocare, nu poate reacționa cu puromicina. Numai după translocare se leagă puromicina.

Există toxine bacteriene care inhibă biosinteza proteinelor la eucariote. Astfel, toxina difterică, produsă de *Corynebacterium diphtheriae*, blochează faza de elongare la eucariote (nu și la procariote) inactivînd translocaza. Toxina difterică este activă în cantități foarte mici, avînd efecte letale în cantități de cîteva mg.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Deutscher M. P., The eucaryotic aminoacyl-tRNA synthetase complex: suggestions for its structure and function, J. Cell Biol., 99, 373—377, 1984.
2. Nomura M., The control of ribosome synthesis, Sci. Amer., 250, 72—83, 1984.
3. Thomas A. A. M., Benne R., Voorma H. C., Initiation of eukaryotic protein synthesis, FEBS Letters, 128, 177—185, 1981.

13. ORGANIZAREA ȘI EXPRIMAREA MATERIALULUI GENETIC LA PROCARIOTE

13.1. TIPUL PARTICULAR DE ORGANIZARE A MATERIALULUI GENETIC (ADN) LA PROCARIOTE: CROMOZOM ȘI PLASMIDE

Modul în care se face stocarea informației genetice la procariote este foarte diferit de cel de la eucariote. Astfel, procariotele au două forme de organizare a materialului genetic (ADN), numite și elemente genetice: *cromozomul* și *plasmidele*.

a. Spre deosebire de eucariote *cromozomul* procariotelor este unic și are o formă circulară. Putem spune că la procariote cromozomul este un simplu inel de ADN de-a lungul căruia se înșiră genele (la *E. coli* circa 4000 de gene). Acest ADN este o moleculă uriașă, de ordinul a 2×10^9 daltoni, care, desfășurată complet, conține un dublu helix cu o lungime de 1100 μm (1,1 mm). *In vivo*, la bacterii această moleculă enormă este împachetată sub forma *nucleoidului*, cu diametrul de numai 1 μm . Înseamnă că și în cazul cromozomului bacterian există o împachetare strinsă a ADN. „Pachetul” sau „ghemul” de ADN poate fi desfăcut parțial dacă se lizează în condiții blinde o bacterie. Se poate observa la microscopul electronic cum din corpul bacteriei pornesc radial bucle de cromatină. La mărire puternică pe fibra de cromatină a buclelor se observă umflături cu diametrul de circa 12 nm (diametrul duplexului de ADN fiind numai 2 nm). Există și în cazul cromatinei de la procariote o împachetare de ordin superior a duplexului de ADN („supercoiling”). Se presupune că aceasta se face printr-o spiralare a duplexului în bucle de cromatină și de aici aspectul de umflături pe fibra de cromatină, ca perlele dintr-un șirag. Există circa 100 bucle pe nucleoid. Fibra de cromatină ce formează cromozomul bacterian este compusă din circa 60% ADN, 30% ARN și 5—10% proteine (din care majoritatea este ADN polimeraza).

Împachetarea strinsă a ADN-ului (supercoiling) pare a fi determinată de prezența ionului Mg^{2+} și a unor molecule mici bazice (unele peptide), care prin sarcinile lor pozitive interacționează cu grupările negative din ADN. S-a precizat localizarea genelor pe cromozomul circular de la bacterii, alcătuindu-se *harta genetică*, de exemplu la *E. coli*. Aceasta s-a putut stabili deoarece în cursul conjugării bacteriilor (o formă de sexualitate întâlnită la bacterii) cromozomul circular din celula masculă se rupe într-un punct și este introdus treptat (transferat) în celula femelă. Numele de pe harta genetică reprezintă intervalele, în minute, de la începutul conjugării în care se transferă genele (transferul complet al cromozomului la *E. coli* durează 89 de minute). Simbolurile genelor pe hartă reprezintă prescurtări legate în majoritate de substrate necesare pentru

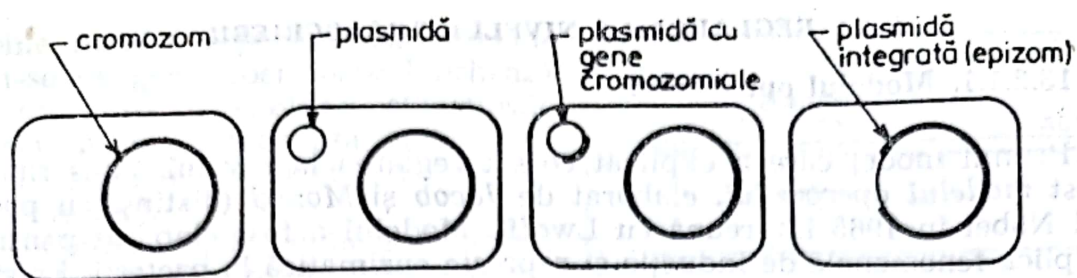


Fig. 13.1. Elementele genetice ale celulei procariote: cromozom și plasmide.

creșterea bacteriilor. De exemplu arg (B-F) reprezintă gene care determină sinteza unor enzime de metabolizare a argininei.

Cromozomul circular bacterian se replică în așa fel încât la celulele fiice să treacă câte un inel complet.

b. Pe lângă cromozom la multe bacterii se mai întâlnește ADN sub forma unui alt inel, mai mic, care se replică în mod autonom față de cromozom și care poate apărea în mai multe copii într-o celulă. Aceste inele de ADN se numesc *plasmide* și fiecare poate conține 2—200 gene. Unele plasmide se pot insera în mod reversibil în cromozomul principal, numindu-se în acest caz și *epizomi*. (fig. 131.1.).

De obicei cromozomul include toate genele esențiale pentru creșterea și multiplicarea bacteriei; plasmidele conțin gene opționale, care largesc posibilitățile de creștere a bacteriei pe diferite medii, oferind posibilitatea folosirii unor surse alternative de hrană sau dând rezistență la substanțe ce inhibă creșterea. Plasmidele sînt de o importanță practică excepțională. Pe de o parte, ele pot conține genele care conferă rezistență la antibiotice, gene ce pot fi transferate de la o tulpină de bacterii la alta. Pe de altă parte, plasmidele sînt folosite în tehnicile de inginerie genetică.

13.2. REGLAREA BIOSINTEZEI PROTEINELOR LA PROCARIOTE (REGLAREA EXPRIMĂRII GENELOR)

Este foarte important ca celulele să-și adapteze concentrația proteinelor, în primul rînd a enzimelor, ca răspuns la condițiile variabile de viață. Tocmai de aceea există mecanisme complexe de control a exprimării genelor, dintre care la procariote cele mai importante sînt cele ce reglează transcrierea.

13.2.1.1. Modelul operonului

Primul model care a explicat corect reglarea la nivelul transcrierii a fost *modelul operonului*, elaborat de *Jacob și Monod* (distinși cu premiul Nobel în 1965 împreună cu Lwoff). Modelul a fost elaborat pentru a explica fenomenele de inducție și represie enzimatică la bacterii. Există enzime care sînt sintetizate cu aceeași viteză indiferent de modificările de mediu; acestea se numesc enzime *constitutive*. În schimb, alte enzime sînt sintetizate numai în prezența unei substanțe numită *inductor*; aceste enzime sînt *inductibile*. Inductorul este de obicei un metabolit din lanțul metabolic din care face parte și enzima respectivă (adesea chiar substratul enzimei). De exemplu, dacă *E. coli* este crescută pe un mediu cu glucoză ca sursă de carbon și energie, există numai cîteva molecule de β -galactozidază. În schimb, dacă bacteria este crescută pe mediu cu lactoză în celule se sintetizează rapid cîteva mii de molecule de β -galactozidază. Deci lactoza este inductorul β -galactozidazei.

În alte cazuri însă, sinteza enzimelor descrește ca răspuns la un anumit metabolit. Acestea sînt *enzimele represibile*, iar metabolitul se numește *corepresor*. De exemplu histidina produce scăderea în celulă a concentrației enzimelor din lanțul metabolic al histidinei.

Jacob și Monod au plecat de la inducția β -galactozidazei de către lactoză. Simultan cu apariția β -galactozidazei, în celulă mai apar alte două

enzime: galactozidpermeaza și galactozidtransacetilază. Genele care codifică aceste trei enzime se numesc *gene structurale* (z, y și a). Ele sînt controlate de alte două gene: *gena reglatoare* (i) și *gena operatorie* (o). Gena operatorie și genele structurale se află una lângă alta pe cromozomul bacteriei, în această ordine (o, z, y, a) și împreună alcătuiesc un *operon* (operonul lactozei sau lac); gena reglatoare se află la o distanță oarecare (de obicei mică de operon, de partea de care se află gena operatorie (fig. 13.2.).

Funcționarea operonului în cazul enzimelor inductibile este următoarea: gena reglatoare determină sinteza unei pro-

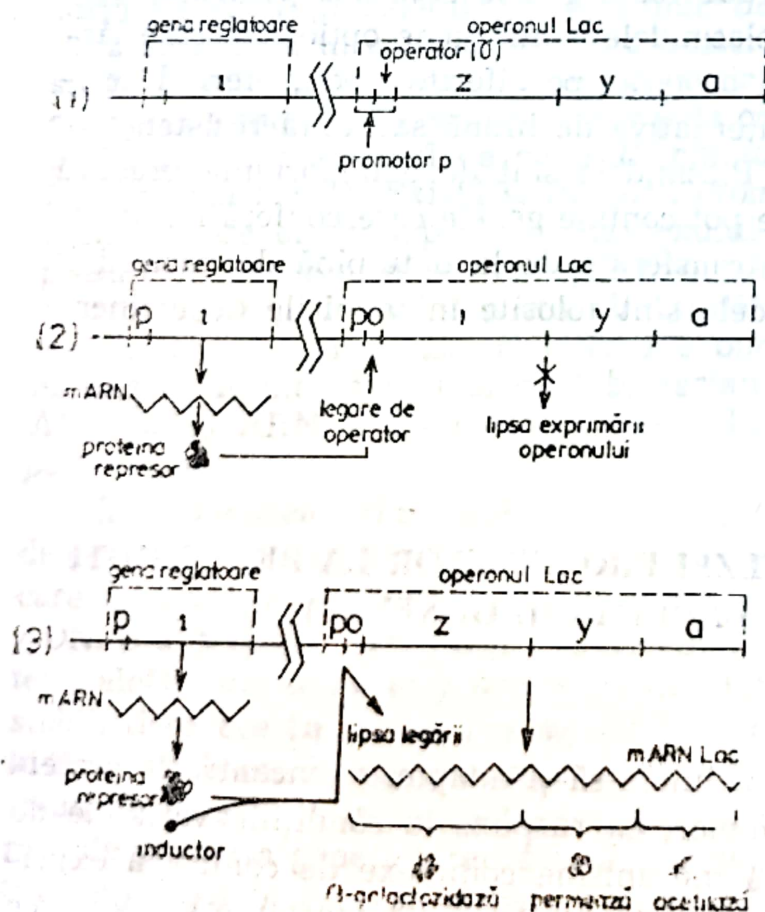


Fig. 13.2. Funcționarea operonului lactozei după modelul elaborat de Jacob și Monod.

teine numită *represor*, care legându-se de gena operatoare blochează transcrierea genelor structurale (deci nu se sintetizează mRNA și nici enzimele codificate de genele structurale).

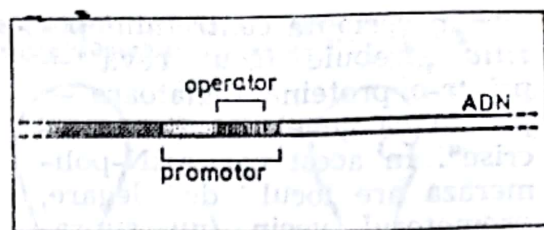
Cînd apare în celulă inductorul, el se leagă de proteina represor, îi modifică conformația prin efect alosteric, astfel că represorul nu se mai poate lega de operator. În acest caz transcrierea genelor structurale este „eliberată”, astfel enzimele codificate de aceste gene pot fi sintetizate.

Astăzi se cunosc și alte detalii ale mecanismului descris. Astfel, modificarea conformației represorului nu o face lactoza, ci allolactoza (ce se formează în celulă din lactoză). Operatorul este o secvență din ADN ce se suprapune peste secvența de ADN de care se leagă ARN polimeraza (secvență numită *promotor*).

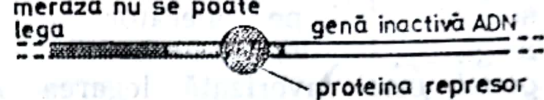
Cînd represorul se leagă de operator, este blocat accesul ARN polimerazei la promotor (fig. 13.3.). Dacă un ligand (allolactoza) se leagă de represor, acesta este desprins de pe operator și atunci ARN polimeraza se poate atașa de promotor. Așa se explică derepresia transcrierii genelor structurale.

În cazul enzimelor represibile funcționarea operonului este următoarea: gena reglatoare produce o proteină *represor* care în mod normal este inactivă (nu se leagă de operator). Dacă însă apare în celulă *corepresorul*, acesta se leagă de represor și îi modifică conformația și acum represorul se poate lega de gena *operatoare* inhibînd legarea ARN polimerazei de *promotor*. Un asemenea caz este operonul *triptofanului*. Triptofanul produce scăderea sintezei enzimelor din lanțul său de metabolizare. Afinitatea represorului pentru legarea de operator este în mod normal mică, dar este crescută prin acțiunea corepresorului. Aceasta este în contrast cu situația operonului *lac* în care *represorul singur este activ*, și abia cînd se leagă de el inductorul își pierde afinitatea pentru operator.

Deși la prima vedere cele două variante par opuse, în esență în ambele cazuri există mai multă transcriere a genelor structurale în cazul în care lipsește proteina reglatoare. De aceea, atât în cazul enzimelor inductibile, cît și al celor represibile se vorbește de *control negativ*: adică „trebuie făcut ceva — prin proteina represor — pentru a opri funcționarea genelor în discuție” (dacă represorul nu este legat de cromozom, se leagă în schimb ARN-polimeraza și deci are loc transcrierea genelor structurale).



Dacă proteina represor este prezentă ADN polimeraza nu se poate lega



Dacă represorul este absent ADN polimeraza se poate lega

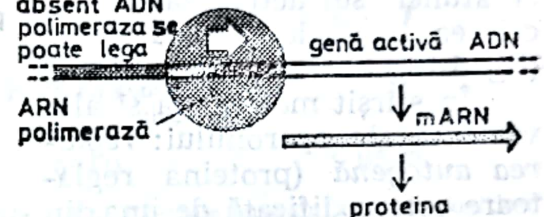
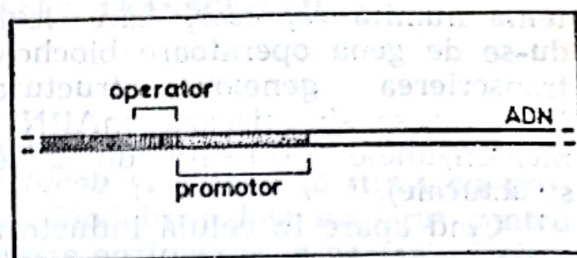


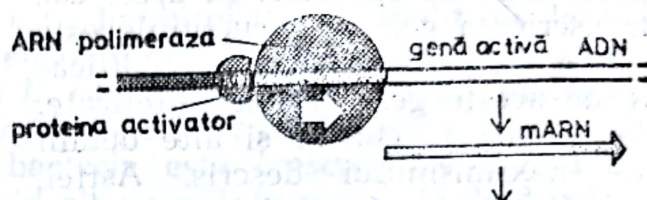
Fig. 13.3. Ilustrarea schematică a funcționării operonului în cazul enzimelor inductibile (control negativ).

În varianta *controlului pozitiv* „trebuie făcut ceva — printr-o proteină reglatoare — pentru ca genele să fie transcrise”. În acest caz ARN-polimeraza are locul de legare, *promotorul*, vecin (nu suprapus), cu *operatorul*. Enzima se leagă slab de promotor. În schimb, când pe operator se leagă o *proteină de activare a genei*, este favorizată legarea ARN polimerazei de promotor și atunci se activează transcrierea genelor structurale (fig. 13.4.).

În sfârșit mai există și alte variante ale operonului: *reglarea autogenă* (proteina reglatoare este codificată de una din genele structurale) și *reglonul* (o genă reglatoare controlează mai mulți operoni).



Dacă proteina activator este prezentă se leagă ARN polimeraza



Dacă activatorul este absent ARN polimeraza nu se poate lega

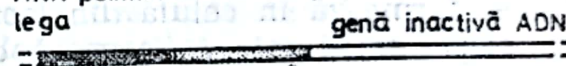


Fig. 13.4. Ilustrarea schematică a controlului pozitiv.

13.2.1.2. Alte mecanisme de control al transcrierii

a. *Afinitatea ARN polimerazei pentru promotor* poate fi crescută prin legarea de acesta a unei proteine specifice în prezență de cAMP. Nivelul de cAMP din celulă variază în funcție de sursa de hrană. Când bacteriile au la dispoziție glucoza (cea mai bogată și eficientă sursă de energie) concentrația cAMP este mică. Când există numai lactoză crește în celulă concentrația de cAMP și acesta împreună cu proteina specifică se leagă de promotor activând transcrierea.

b. *Afinitatea ARN polimerazei pentru promotor* se poate modifica (crește sau scade) și prin *acțiunea directă a unor proteine asupra ARN polimerazei*. Așa este cazul unor proteine sintetizate în bacteriile infectate cu fagul T4. De altfel în celule în mod normal afinitatea ARN polimerazei pentru promotorii diferiților operoni variază foarte mult. Astfel unele enzime se sintetizează în cantitate mai mare și altele în cantitate mai mică. Acesta este un mecanism de control „ieftin” pentru celulă, fiindcă nu necesită o genă reglatoare. Mecanismul operonului este „scump” fiindcă o genă reglatoare produce o proteină reglatoare și abia aceasta reglează activitatea ARN-polimerazei. Dacă ar exista numai mecanismul operonului, celula ar fi plină cu proteine a căror funcție ar fi numai de a controla genele în loc să aibă direct rol în metabolism.

În ultimii ani s-au înregistrat progrese în descifrarea biologiei moleculare a interacțiunii dintre ARN polimerază și promotor, adică regiunea din ADN unde se leagă această enzimă. Compararea secvențelor de ADN ale diferiților promotori a dezvăluit existența unor secvențe de consens („consensus sequence”) ce apar în mulți promotori, în aceleași poziții

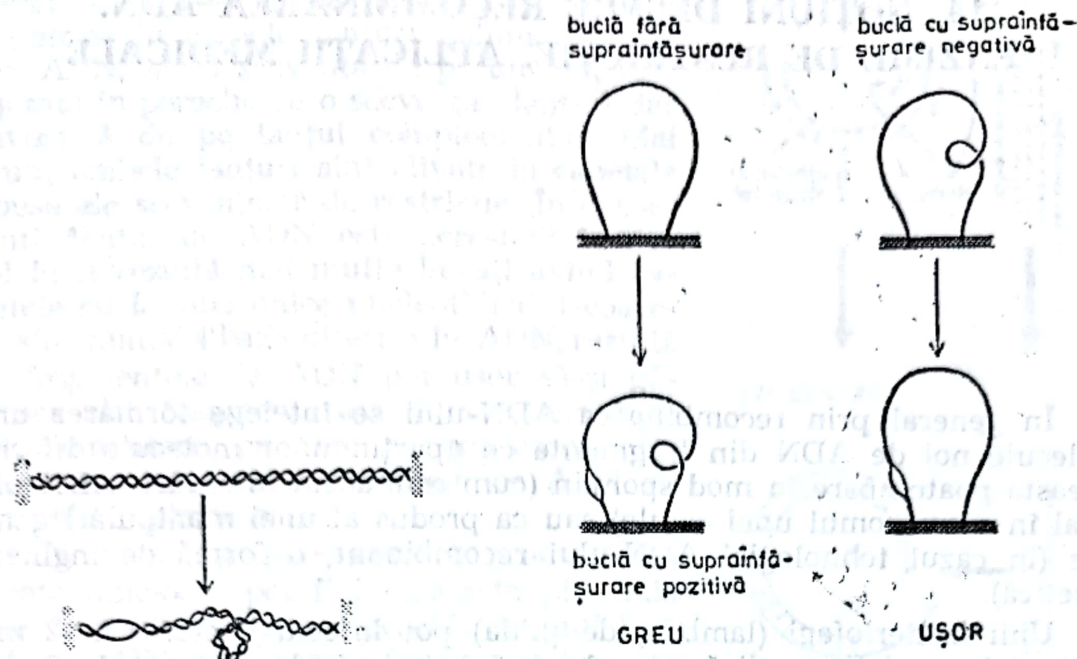


Fig. 13.5. Ilustrarea tensiunii ce apare în ADN (prin supraînfășurare) la desfacerea duplexului pentru începerea transcrierii.

Fig. 13.6. Efectele supraînfășurării pozitive și negative asupra desfacerii duplexului de ADN pentru a începe transcrierea (figurile 13.3—13.6. sînt după Alberts și colab.).

față de punctul de începere al transcrierii (poziția 0). Astfel, în poziția —10 (deci cu 10 perechi de baze „în sus”, spre capătul 5' al mARN-ului) apare secvența TATAAT (numită „cutia Pribnow”) iar în poziția —35 secvența TTGACA. Asemenea secvențe sînt descrise și pentru zona în care se leagă proteina CAP. Nu se știe precis cum intervin secvențele de consens în reglarea exprimării genelor.

c. *Supraînfășurarea ADN-ului* („supercoiling”) este un alt mecanism de control al transcrierii. S-a spus la transcriere că legarea ARN-poli-merazei produce desfacerea locală a unei ture de ADN (deci a circa 10 perechi de baze). Dar aceasta presupune o *supraînfășurare* de compensare într-o zonă vecină din ADN (fig. 13.5.), ceea ce creează o tensiune în duplex. Acest dezavantaj este însă transformat în avantaj, deoarece o enzimă, *ADN giraza*, folosește ATP spre a produce o *supraînfășurare negativă*, adică de sens contrar celei din fig. 13.5. În acest fel se favorizează desfacerea locală a duplexului și legarea transcriptazei, care produce înlăturarea tensiunii din duplex (fig. 13.6.).

13.2.2. Reglarea la nivelul traducerii

a. Durata supraviețuirii mARN-ului înainte de a fi degradat determină cantitatea de proteină sintetizată de ribozomi pe această matriță. O proteină ce necesită fluctuații rapide în concentrație este codificată de un mARN cu viață scurtă, astfel ca efectele represiei genei să fie simțite rapid. Durata de viață a mARN-ului este variabilă, în medie două minute.

b. Variațiile în structura mARN-ului produc și ele variații în viteza traducerii.

14. NOȚIUNI DESPRE RECOMBINAREA ADN. ENZIME DE RESTRICȚIE, APLICAȚII MEDICALE

În general prin recombinația ADN-ului se înțelege formarea unei molecule noi de ADN din fragmente ce aparțin unor molecule diferite. Aceasta poate apărea în mod spontan (cum este cazul integrării ADN-ului viral în cromozomul unei celule) sau ca produs al unei manipulări genetice (în cazul tehnologiei ADN-ului recombinant, o formă de inginerie genetică).

Unii bacteriofagi (lambda, de pildă) pot infecta bacteria în 2 moduri: a) în mod *litic*, adică se multiplică în celulă, după care o lizează și virionii sunt eliberați urmând să infecteze alte celule; b) *lizogenic*: în acest caz ADN-ul fagului este integrat, legat covalent în cromozomul bacteriei, sub formă de *profag*, bacteria fiind numită *lizogenă* (fig. 14.1.). Virusul moderat sau temperat este transmis celulelor-fiice prin diviziune și în anumite condiții poate să fie excitat din cromozomul bacteriei și să se multiplice producând liza celulei.

Recombinări ale ADN pot apărea și între plasmidă și cromozomul bacterian; aceste recombinații sunt cele care în ultimii ani au produs o revoluție în biologia moleculară, deschizând noi perspective manipulărilor genetice (sau ingineriei genetice).

Tehnica recombinației ADN are la bază utilizarea *enzimelor de restricție*, descoperite acum 15 ani la unele bacterii, unde joacă rol de protecție a lor față de ADN străin. Aceste enzime sunt endonucleaze care scindează ADN într-un mod particular: ele recunosc secvențe specifice,

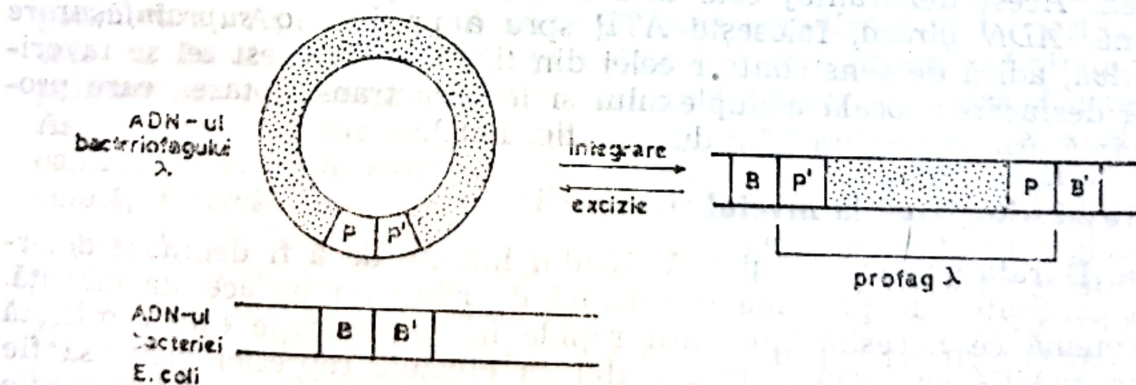


Fig. 14.1. Schema recombinației reciproce a ADN-ului bacteriofagului lambda și a ADN-ului bacteriei E.coli, ADN-ul fagic poate fi integrat în cromozomul bacteriei sub formă de profag (în cazul infecției lizogene) sau poate fi excizat din cromozom și apoi prin multiplicare produce liza celulei (în cazul infecției litice).

restrînse la 4—8 nucleotide; secvențele sînt simetrice în ambele lanțuri polinucleotidice din ADN, adică secvența de pe un lanț este așezată în pereche cu o secvență identică dar inversată de pe lanțul complementar. Mai mult, ambele lanțuri sînt clivate la capetele opuse ale secvențelor de restricție. În consecință lanțul de ADN este „crestat” în așa fel încît rezultă mai multe bucăți avînd capetele cu lanțuri unice nucleotidice. Deoarece sînt numai 4 baze diferite în ADN, rezultă că fragmentele de ADN pot ușor să-și găsească alte fragmente avînd la capete baze complementare, cu care se pot asocia. De aceea se spune că fragmentele de ADN au capetele „lipicioase”.

În 1973 s-a descoperit că aceste fragmente lipicioase pot fi inserate în plasmida unei bacterii. Aceasta a deschis drumul tehnologiei ADN-ului recombinant, prin care se pot introduce în plasmide gene străine, chiar de la alte specii. Plasmidele sînt apoi introduse în celule bacteriene (*E. coli*) și se multiplică odată cu înmulțirea bacteriilor. Produsul genei inserate în plasmidă poate fi astfel izolat din culturile bacteriilor respective.

În principiu tehnica recombinării moleculare implică următoarele faze: (fig. 14.2.). Plasmida împreună cu ADN străin sînt scindate cu o anumită enzimă de restricție. Rezultă desfacerea inelului plasmidei și clivarea ADN străin în fragmente cu capetele „lipicioase”. În anumite condiții fragmentele de ADN sînt inserate în plasmidă, iar capetele sînt legate covalent cu ajutorul ADN ligazei. Apoi plasmida este introdusă într-o celulă bacteriană modificînd suprafața celei prin încălzire în prezența clorurii de calciu. Celula devine transformată și în ea plasmida va fi replicată, astfel că la diviziune fiecare celulă-fiică primește nu numai o copie a cromozomului, ci și o copie a plasmidei. După ce plasmidele se multiplică în celulă, ADN-ul plasmidei poate fi purificat după lizarea celulei.

Această tehnică deschide perspective uriase biologiei și medicinei. Pe de o parte permite studierea mecanismelor de reglare a genelor la mamifere, dar mai ales permite

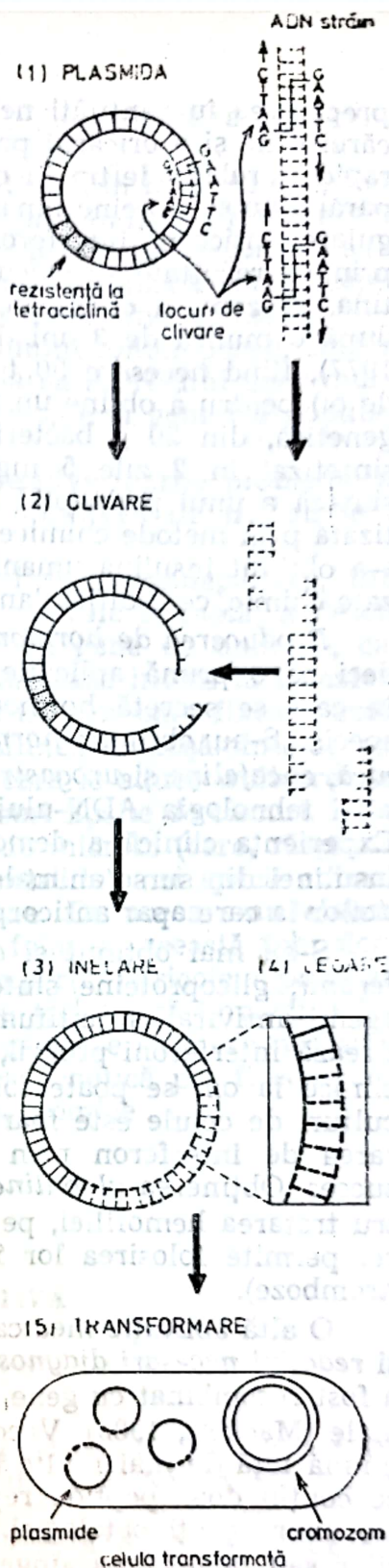


Fig. 14.2. Schema recombinării moleculare ce stă la baza experiențelor de manipulare genetică (tehnologia ADN recombinant), prin care un ADN străin este legat de ADN-ul plasmidei și este introdus într-o celulă bacteriană.

prepararea în cantități nelimitate, într-o formă ușor de purificat, a oricărei gene și a oricărui produs al ei. Se știe că bacteriile pot fi cultivate rapid și relativ ieftin în cantități enorme. Se deschide posibilitatea preparării unor proteine umane de interes medical: hormoni, factori de coagulare, anticorpi, interferoni, vitamine, medicamente, antibiotice. De fapt, primele rezultate spectaculare au și fost obținute. Hormonul somatostatina, prezent în creier în proporții infime, a fost izolat în 1968 după o muncă de 3 ani de către R. Guillemin și colab. (premiul Nobel 1977), fiind necesare 50 tone fragmente de hipotalamus (de la 5.000.000 de oi) pentru a obține un mg de somatostatina. În 1977 prin recombinare genetică, din 20 g bacterii cultivate în 10 litri mediu de cultură s-au sintetizat în 2 zile 5 mg somatostatina. Aceasta a reprezentat prima sinteză a unui polipeptid funcțional (14 aminoacizi) printr-o genă sintetizată prin metode chimice și introdusă într-o plasmidă la *E. coli*. În 1979 s-a obținut insulina umană prin exprimarea la *E. coli* a genelor sintetizate chimic, ce codifică lanțurile A și B ale insulinei.

Producerea de hormoni prin tehnologia ADN-ului recombinant apare deci ca o primă aplicație medicală importantă, datorită cantității mici în care se secretă hormonii (dificultatea preparării) și specificității de specie. S-au obținut: *hormonul de creștere uman, somatotropină corionică, encefaline și urogastronă. Insulina umană* este primul produs obținut prin tehnologia ADN-ului recombinant care a fost deja comercializat. Experiența clinică a demonstrat că are o eficiență terapeutică similară insulinei din surse animale. Insulina umană este indicată în cazul diabeticii la care apar anticorpi față de insulina umană.

S-au mai obținut și *alte proteine de interes medical*. Astfel *interferonii*, glicoproteine sintetizate de celulele infectate cu virusuri, sînt agenți antivirali și antitumorali. Deoarece fiecare specie de animal sintetizează interferoni proprii, în forme moleculare specifice, pentru scopuri clinice la om se poate folosi numai interferon uman. Obținerea lui pe culturi de celule este foarte dificilă, cu randament mic, de aceea prepararea de interferon prin tehnologia ADN recombinant este un mare succes. Obținerea *globulinei antihemofilice* este de mare importanță pentru tratarea hemofiliei, pe cînd obținerea *plasminogenului* și a *urochinezei* permite folosirea lor în scopul dizolvării cheagurilor intravasculare (tromboze).

O altă aplicație medicală o constituie producția de *antigene, anticorpi și reactivi necesari diagnosticului*. (Murray, 1984). Astfel, virusul vaccinal a fost recombinat cu gene ale unor virusuri patogene pentru om sau animale (Mackett, 1985). Vaccinarea cu un astfel de virus conferă protecție imună față de mai multe boli. S-a născut o nouă generație de vaccinuri ce conțin doar peptide reprezentînd grupările antigenice imunoreactive ale unor agenți patologici. Aceste peptide servesc la detectarea purtătorilor sau la testarea sîngelui pentru transfuzii. Astfel, s-a realizat producerea antigenelor virusului hepatitei B și a virusului ce produce sindromul de insuficiență imunologică dobîndită (AIDS).

Peptidele reprezentînd grupările imunoreactive pot servi și la *diagnosticul cancerului* (Samuel și colab., 1984). Pe de altă parte prin ADN recombinant se poate preciza originea clonală a unei tumori (Vogelstein și colab., 1985), după cum se pun speranțe și în obținerea unor

produse pentru *tratarea cancerului*: factorul de necroză al tumorilor (Gray și colab., 1985).

Tehnologia ADN-ului recombinant a intrat deja în practica *diagnosticului unor boli genetice* (inclusiv diagnostic prenatal); de asemenea se speră că va servi la tratarea bolilor genetice prin *terapie genică*, adică prin sinteza artificială a genelor deficitare (care codifică enzima respectivă), urmată de introducerea lor în celulele unde sînt necesare.

Această tehnologie revoluționează viața omului contemporan, aducînd aplicații din cele mai diverse, cum este și clonarea ADN-ului unor mumii egiptene (Pääbo, 1985) cu importanță în arheologie și genetica populațiilor.

Dar ingineria genetică este chemată să rezolve marile probleme ale omenirii, cum sînt cele agroalimentare sau obținerea de noi surse de energie.

Realizarea hibridilor celulari între specii foarte îndepărtate, între plante și animale, care nu se pot încrucișa pe cale sexuală, a deschis perspectiva realizării unor hibrizi de plante cu gene de animale, care să poată deci sintetiza proteine animale. Se lucrează intens la transferul în cromozomii plantelor a genelor microorganismelor care fixează azotul atmosferic; în acest caz s-ar elimina necesitatea îngrășămintelor azotoase, cu toate cheltuielile și dificultățile pe care le aduce utilizarea lor.

Experiențele de manipulare genetică nu sînt lipsite de riscuri. Există teoretic posibilitatea de a se crea noi specii de microbi (care, răspîndindu-se în natură, să producă epidemii necontrolabile), noi specii animale, monștri, himere sau chiar personalități umane. De aceea s-au elaborat reguli speciale de lucru în laboratoarele ce folosesc această tehnologie, iar experiențele trebuie aprobate de către experți. Pericolele potențiale ale noii tehnologii, deși trebuie cunoscute, nu trebuie să împiedice folosirea ei în scopul realizării de noi programe genetice conform necesităților omenirii. Posibilitățile oferite de ingineria genetică pot fi comparate cu cele pe care le-a adus descătușarea energiei atomice.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Chang N. T. și colab., An HTLV-III peptide produced by recombinant DNA in immunoreactive with sera from patients with AIDS, *Nature*, 315, 151—154, 1985.
2. Glover D. M., *Gene cloning. The mechanics of DNA manipulation*, Chapman and Hall, London, 1984.
3. Gray P. W., Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumor necrosis activity, *Nature*, 312, 721—724, 1984.
4. Howe T. R., Mayer L. W., Barbour A. G., A single recombinant plasmid expressing two major outer surface proteins of the Lyme disease spirochete, *Science*, 227, 645—646, 1985.

15. TIPURI PARTICULARE DE ORGANIZARE ȘI EXPRIMARE ALE MATERIALULUI GENETIC LA VIRUSURI

Virusurile au în structura lor un singur fel de acid nucleic; deci există virusuri cu ADN și virusuri cu ARN. Acidul nucleic este materialul genetic și materialul infecțios al virusului. Rezultă că la virusurile cu ARN, spre deosebire de celule și de virusurile cu ADN, apare o particularitate importantă: *ARN-ul joacă rolul de a depozita informația genetică*. Secvența nucleotidelor din ARN reprezintă în acest caz informația genetică. Un asemenea virus este virusul mozaicului tutunului.

Virusurile au acidul nucleic îmbrăcat în *capsida* proteică, iar la unele virusuri și într-un *înveliș* ce conține lipide și glicoproteine. Numărul de gene variază de la 3 (la cele mai simple) până la 250.

Studiul virusurilor a jucat un rol de seamă în apariția concepției biologiei moleculare (relația structură-funcție la nivel molecular) și a dus la o serie de importante descoperiri.

Virusurile cu ADN au particularități de organizare a materialului genetic. Astfel, la unele virusuri ADN-ul dublu catenar (duplex) poate avea formă lineară sau circulară. La bacteriologul lambda (λ) există chiar interconversiunea dintre forma lineară din particula virală și forma circulară în celula gazdă.

Alte virusuri au ADN monocatenar circular (format dintr-un singur lanț polinucleotidic, cum este bacteriofagul ϕ x 174).

La *virusurile cu ARN* amintim trei particularități de exprimare a materialului genetic: 1) în unele cazuri ARN viral introdus în celula gazdă funcționează direct ca mARN; 2) în alte cazuri ARN viral servește ca matrită pentru sinteza de mARN în celula gazdă; 3) ARN viral servește ca matrită pentru sinteza de ADN în celula gazdă, apoi acest ADN este transcris în mARN.

Acest ultim caz este de mare importanță, deoarece a dus la completarea cunoștințelor privind fluxul informației genetice în celule. S-a descoperit această particularitate la *virusurile oncogene cu ARN* (oncorna virusuri), care produc tumori la unele animale. Primul a fost descoperit de Rous în 1911, virusul ce produce sarcom la găini. După circa 50 ani, Temin a constatat că dezvoltarea tumorii este inhibată atât de către inhibitorii biosintezei ADN-ului (ametopterina, arabinozilcitozina), cât și de către actinomicina D (inhibitor al biosintezei ARN-ului). El a sugerat că în multiplicarea virusurilor oncogene cu ARN pe matrită de ARN se sintetizează ADN și acesta la rândul său servește ca matrită pentru sinteza de mARN. Deci fluxul informației genetice în acest caz este: $ARN \rightarrow ADN \rightarrow ARN \rightarrow$ proteine.

Fiind în contradicție cu „dogma centrală a biologiei moleculare“, ipoteza lui *Temin* este primită cu rezervă, dar în 1970 *Temin* și, independent, *Baltimore*, izolează enzima capabilă de a sintetiza ADN pe matriță de ARN, numită *ADN polimerază-ADN dependentă* sau *transcriptază inversă*. Această enzimă sintetizează ADN în direcția 5'→3' și folosește primeri scurți de ARN. Deci „dogma centrală a biologiei moleculare“ trebuie completată în sensul reversibilității fluxului informației genetice între ADN și ARN:

ADN $\rightleftharpoons$ ARN $\rightarrow$ proteine.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Coffin, J. M., Structure, replication and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses, *J. Gen. Virol.*, 42, 1—26, 1979.
2. Ivanof A., Sașcă C., Vancea D., Curs de microbiologie (Partea a III-a) Virusologie, Litografia I. M. F. Cluj-Napoca, 1980.
3. Temin H. M., Baltimore D., RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses, *Adv. Virus Res.*, 17, 129—185, 1972.

16. REGLAREA BIOSINTEZEI PROTEINELOR (A EXPRIMĂRII GENELOR) LA EUCARIOTE ȘI DIFERENȚIEREA CELULARĂ

Mecanismele prin care celula eucariotă controlează biosinteza proteinelor sînt mult diferite de cele din celula procariotă. În plus, la eucariote reglarea biosintezei proteinelor are și o semnificație mai profundă: deși toate celulele somatice ale unui organism pluricelular conțin aceiași cromozomi, același set de gene, totuși celulele sînt diferite. Neuronul, celula musculară, celulele epiteliale și altele sînt morfologic și funcțional foarte diferite. Celulele devin diferite deoarece în decursul dezvoltării embrionului are loc *diferențierea celulară*, proces ce se datorează faptului că fiecare celulă sintetizează anumite proteine. Deși există proteine comune întîlnite în toate celulele (cele ale citoscheletului, ale organelor celulare etc.), fiecare tip de celulă sintetizează proteine specifice, aceasta fiind explicația faptului că ele au structuri și funcții diferite. O celulă eucariotă superioară sintetizează 10.000—20.000 proteine diferite.

16.1. REGLAREA PRIN MODIFICĂRI DIRECTE ALE GENELOR

1. *Eliminarea unor cromozomi sau porțiuni de cromozomi* din celulele somatice se întîlnește la unele protozoare, nematode, crustacee, insecte, dar nu pare a fi un mecanism general, nefiind evidențiat la eucariotele superioare. În cazurile amintite setul complet de gene rămîne numai pe cromozomii din celulele sexuale.

2. *Rearanjamentele genelor* pe cromozomi reprezintă un mecanism comun cu procariotele. Fenomenul a fost descoperit prin anii '40 la porumb de către *Barbara McClintock* (premiul Nobel în 1982) și de-abia în ultimii ani a reieșit importanța sa generală.

3. *Amplificarea genelor* este procesul prin care în faza S a ciclului celular, în loc ca fiecare genă să fie replicată o singură dată, au loc replicări repetate ale unor gene (porțiuni de cromozomi). Procesul se întîlnește în mod normal în cazul replicării genelor ribozomiale (vezi cap. „Nucleolul”) și în alte cazuri.

Recent însă, amplificarea a devenit o preocupare centrală legată de rezistența la medicamente și carcinogeneză. Dacă celule în cultură sînt expuse la un medicament, după un timp se pot izola linii celulare

devenite rezistente, care produc în cantitate mare o enzimă specifică pentru acel medicament. Secvența de ADN ce codifică această proteină este amplificată selectiv, în zone cromozomiale expandate sau chiar extracromozomiale. S-a observat că asemenea amplificări se produc și la bolnavi tratați cu citostatice, deci este o problemă în chimioterapia cancerului. Dar amplificarea pare a fi și o caracteristică a celulelor tumorale, fiindcă a fost observată și la celule maligne de la pacienți care nu au primit citostatice (Hamli și colab., 1984).

4. **Metilarea ADN-ului** reprezintă un alt mecanism de activare a genelor: genele inactive sînt metilate în măsură mai mare (prin formarea 5-metilcitozinei din citozina din ADN). Dacă la celule în cultură se adaugă 5-aza citozină (analog al citozinei care nu poate fi metilat), acesta se încorporează în ADN producînd o scădere a metilării ADN-ului. Dacă această experiență se face cu fibroblaste în cultură, acestea se diferențiază ulterior într-o varietate de celule pe care altfel nu le formează niciodată, inclusiv în celule musculare. Mecanismul precis prin care metilarea ADN-ului reglează exprimarea genelor nu se cunoaște. Este posibil să producă modificări în conformația ADN-ului, în locul formeii B, cea „clasică” descrisă de Watson și Crick, să apară forma Z (duplex înfășurat spre stînga) sau să servească drept semnal pentru transcriptază (Doerfler, 1981; Cooper, 1983).

16.2. REGLAREA LA NIVELUL TRANSCRIERII

Se pare că în primul rînd reglarea la nivelul transcrierii este hotărîtoare pentru diferențierea celulară, deci pentru a se stabili ce fel de proteine va produce o celulă.

Ca principiu general în celula eucariotă predomină *reglarea pozitivă*, adică prin activarea transcrierii genelor. Acest lucru este logic, dacă ne gîndim că doar 7% din ADN-ul celulei eucariote este transcris, este puțin probabil ca 93% din ADN să fie reprimat prin zeci de mii de represori. Este mai logic să considerăm că în celula eucariotă există un mecanism general de represie a genelor și proteinele reglatoare sînt activatoare, deci activează transcrierea (vezi și cap. 13).

Tot ca principiu general: reglarea transcrierii trebuie să fie legată de particularitățile de structură a cromatinei la eucariote.

1. **Histonele și condensarea cromatinei** reprezintă un prim mecanism de reglare a transcrierii. Dacă cromatina este condensată (deci sub formă de heterocromatină), ARN-polimeraza nu are acces la ADN și nu se produce transcrierea. **Histonele H1** produc condensarea cromatinei, iar fosforilarea ei sub acțiunea unei enzime dependente de cAMP determină asocierea H1 cu nucleozomii. **Acetilarea histonelor** din nucleozomi, legarea de nucleozomi a două proteine mici nehistonice (**HMG 14** și **HMG 17**), ca și legarea de **histonele H2 a ubiquitinei**, toate produc decondensarea cromatinei (convertirea de la fibra de 30 nm în filamentul subțire de 10 nm) și deci activează genele.

2. *Proteinele cromozomiale nehistonice* joacă un rol important în determinarea genelor care sînt exprimate într-o anumită celulă. O experiență este sugestivă: J. Paul a extras proteinele cromozomiale nehistonice din celulele precursorale ale hematiilor (celulele eritroide), singurele celule din organism ce produc globina (proteina din hemoglobină). Apoi a reasamblat aceste proteine cu cromatină din creier, de pe care în prealabil disociase proteinele nehistonice. Astfel reconstituită, cromatina din creier a fost capabilă să sintetizeze mRNA-ul matriță pentru globină. Detaliile prin care proteinele nehistonice determină exprimarea unor gene specifice nu se cunosc, dar se pare că ele se leagă de locuri reglatoare de pe anumite gene pe care le fac accesibile transcrierii (posibil prin dislocuirea H1 sau modificarea chimică a ei).

S-a emis și ipoteza că proteinele cromozomiale nehistorice ar fi produse de unele *gene de control* care apar asociate fiecărei *gene structurale* din celule. De pildă o genă structurală (1) este activată de genele de control asociate ei (A, B, C, D) numai în țesuturile în care există unul din activatorii genelor A-D. O altă genă structurală (2), asociată cu genele de control E, F, G, H, va fi activată de unul din activatorii acestor gene. Deci genele de control sînt activate diferit în funcție de țesut și la rîndul lor activează diferențiat genele structurale. Ipoteza (emisă în 1969 de Britten și Davidson) derivă din observarea unei particularități a genomului eucariotic: repetarea în multe zone a unor secvențe scurte de ADN (de circa 300 perechi de baze, de mai multe feluri, numite *secvențe de ADN repetitiv dispersat*). Acesta trebuie deosebit de alte secvențe repetitive ce apar la eucariote și care nu sînt niciodată transcrise (*ADN satelit*). Funcția secvențelor repetitive nu este încă bine cunoscută deși recent au fost semnalate și la procariote (Watson, 1985).

Proteinele cromozomiale nehistonice ar interveni și în controlul final reglării biosintezei proteinelor, adică în adaptarea ei prin mecanismul inducției sau represiei genelor individuale. Proteinele nehistonice ar putea suferi modificări conformaționale prin fosforilare sub acțiunea unor kinaze activate de cAMP, acesta fiind la rîndul său mesagerul unor hormoni hidrosolubili care se leagă de receptori din membranele celulare.

Spre deosebire de procariote, la eucariote mecanismul inducției sintezei enzimelor este mai complex (vezi și cap. „Reticulul endoplasmic neted”). Se descriu noi situații cu importanță fiziologică, de pildă inducția enzimelor digestive în celulele intestinale sub acțiunea substratului, deși mecanismul nu este clar (Reisenauer și Gray, 1985).

3. Transcrierea este reglată și la eucariote (ca și la procariote) de *secvențe de consens*, ce apar identice (sau foarte asemănătoare) pentru diferite gene și care sînt situate pe promotor (locul de legare al transcrip-tazei) în poziții anterioare celei de începere a transcrierii (poziția 0). Astfel, aproximativ la 30 perechi de baze „în sus” pe promotor se află secvența TATA (numită „cutia TATA”), iar la 70—90 perechi de baze „în sus” se află o altă secvență. Nu reamintim că și la procariote existau secvențe de consens în promotori. La eucariote se pare că asemenea secvențe asigură nu numai inițierea și eficiența transcrierii, dar ar putea să joace rol și în diferențierea celulară, fiind preferențial activate de factori tisulari (Chambon și colab., 1984).

4. Transcrierea este crescută prin intervenția unor *secvențe de ADN de accentuare* („enhancers”), aflate la distanță destul de mare (peste 110 perechi de baze) de poziția 0 (startul transcrierii). Asemenea secvențe potențează inițierea transcrierii unor gene virale sau celulare (cum sînt și cele ale imunoglobulinelor). Se pare că de secvențele de accentuare se leagă factori tisulari specifici deși funcția biologică precisă nu este cunoscută (Chambon și colab., 1984, Mercola și colab., 1985). La nivelul acestor secvențe ar putea acționa și hormonii steroizi și tiroidieni.

Tot la nivelul unor secvențe de pe promotori se activează transcrierea unor gene care codifică proteine speciale ce apar în șocul termic. Este posibil ca șocul termic să producă apariția în citoplasmă a unui factor de activare a transcrierii, care se leagă de promotor de o secvență situată înaintea „cutiei TATA” (Benz, 1985).

5. *Acțiunea hormonilor steroizi* reprezintă un exemplu „clasic” de reglare a biosintezei proteinelor la eucariote, deși mecanismul precis este încă în discuție.

Spre deosebire de hormonii hidrosolubili ce se leagă de receptori din plasmalemă și își exercită efectele prin cAMP (mesagerul de ordinul II), hormonii liposolubili trec prin plasmalemă și se leagă în citoplasmă de un receptor specific. Astfel activat, complexul trece în nucleu și aci se leagă de cromatină activînd transcrierea unor gene. Astfel se declanșează în celulele „țintă” sinteza de proteine specifice care se traduc în apariția caracterelor sexuale secundare. Prin acest mecanism acționează atît hormonii estrogeni (feminini), cît și cei androgeni (masculini) și cortizolul.

Absența receptorilor citoplasmatici duce la apariția unor boli genetice grave. De pildă lipsa receptorului pentru hormonul dihidrotestosteronă produce „feminizarea testiculară” în care, deși genotipul este masculin (46, XY), fenotipul (aspectul exterior) este de femeie. Lipsește însă uterul, datorită acțiunii inhibitoare a unui factor produs de gonada embrionară de tip masculin.

În cazul *hormonilor tiroidieni* receptorii se află în nucleu, iar mecanismul de acțiune este tot cel de activare a transcrierii anumitor gene specifice.

16.3. REGLAREA LA NIVELUL ÎNNĂDIRII ARN-ULUI

Aceasta poate apare prin variații ale capetelor ce sînt legate. Chiar o singură bază în plus ori în minus la un capăt al fragmentelor legate duce la sinteza unor proteine diferite. Acest mecanism are o importanță crucială pentru apariția de noi proteine în cursul evoluției, dar și în explicarea posibilității ca o genă să codifice două proteine diferite (la unele imunoglobuline). De asemenea, defecte în procesul înnădirii ARN-ului duc la apariția de boli genetice, cum sînt β -talazemiile (anemii hemolitice cu lanțuri beta de globină anormale sau absente).

16.4. REGLAREA LA NIVELUL TRADUCERII

Mecanismele de reglare a biosintezei proteinelor la nivelul traducerii la procariote își păstrează importanța și la eucariote. Apar însă și mecanisme noi.

1. *Stabilitatea moleculei de mRNA* la eucariote este mult mai mare, *timpul de viață al mRNA-ului* fiind de ore până la zile. Recent s-a descris un exemplu interesant de reglare a sintezei proteinelor prin stabilitatea moleculei de mRNA. Se știe că hormonul prolactină stimulează secreția de lapte. În absența prolactinei s-a observat că mRNA-ul pentru cazeină (proteină din lapte) devine labil.

Un alt exemplu important este cazul unor stări dormante (semințe, embrioni închistați, ouă nefertilizate). În acestea mRNA-ul poate rămâne stabil și inactiv luni de zile. La fertilizarea oului se produce brusc activarea mRNA-ului, și astfel începe sinteza multor proteine.

2. Există proteine citoplasmatiche care se leagă de mRNA formînd complexe în care mRNA-ul nu este activ. De asemenea există proteine care se leagă de polizomi și împiedică traducerea. Aceste complexe sînt numite *ribonucleoproteine mesagere* („messenger ribonucleoproteins”) sau *informozomi* (Spirin și Ajtkhozin, 1985). Este posibil ca aceste proteine să determine menținerea în stare stabilă (dar inactivă) a mRNA-ului în stările dormante amintite mai sus.

16.5. REGLAREA POST-TRADUCERE (DUPĂ SINTEZA LANȚULUI POLIPEPTIDIC)

O modalitate de reglare a exprimării genelor la eucariote o reprezintă *scindarea unui lanț polipeptidic precursor* („proproteină” sau „pre-proproteină”, cum este cazul insulinei) în fragmentele finale sau chiar sinteza unei *poliproteine*: un lanț polipeptidic lung ce are mai multe locuri active (fiecare echivalînd cu o proteină).

În sfîrșit, un mecanism particular eucariotelor este *durata de viață a proteinelor după sinteză*. La procariote acest mecanism nu este necesar, fiindcă, odată încetată sinteza unei proteine care nu mai este necesară celulei, aceasta va fi rapid „diluată” prin diviziuni celulare ce se succed rapid (la fiecare 20 minute concentrația proteinei se reduce la jumătate). În schimb la eucariote diviziunile se succed mai rar (ciclul celular durează 24 ore), iar unele celule nu se mai divid după naștere (neuronii, celulele musculare). Tocmai de aceea, un mecanism specific eucariotelor este degradarea proteinelor în lizozomi. După cum degradarea este accelerată sau încetinită, se poate regla cantitatea unei proteine în celulă. Un exemplu clasic este dublarea în cîteva zile a concentrației enzimei numită *arginază* în celula hepatică la șobolanii flămînzi. Aceasta nu se face prin sinteză crescută a enzimei, ci prin reducerea degradării.

S-a spus că toate celulele conțin întregul set de gene al unui organism. Mai mult, dintr-o celulă izolată a unui organism se poate produce un organism întreg, prin tehnica clonării. Clonarea este formarea pe cale asexuată a unui descendent identic cu originalul, pornind de la o singură celulă. Astfel, s-au obținut morcovi (întreaga plantă) din culturi de celule individuale (Steward, 1964), la fel plante de tutun din celule individuale. Mai mult, Nitsch (1969) a crescut o plantă de tutun pornind de la un spor haploid, ceea ce a demonstrat că doar o singură genă din fiecare pereche de cromozomi omologi este necesară pentru diferențiere. Mai spectaculoase au fost experiențele care au reușit să cloneze broaște, folosind nucleul de la o celulă intestinală a unui mormoloc de broască, implantat în ouă de broască nefecundate din care se îndepărtase în prealabil nucleul. Posibilitatea de a produce un organism complet dintr-un nucleu al unei celule diferențiate a suscitat un mare interes practic și teoretic. Practic se întrevade posibilitatea de a produce prin clonare animale domestice identice din punct de vedere genetic, deci la care sînt prezente cele mai favorabile însușiri necesare, excluzînd posibilitatea amestecării genelor, inerentă reproducerii sexuale.

Pe linie teoretică experiențele de transplant nuclear au demonstrat că diferențierea este rezultatul unui mod particular de exprimare a genelor într-o celulă care are toate genele caracteristice unei specii. Se pune întrebarea de ce unele gene sînt exprimate într-o celulă și altele nu. Experiențele de clonare a broaștelor demonstrează influența citoplasmei asupra nucleului, fiindcă potențialul genetic al nucleului transplantat (de la celula intestinală a mormolocului) nu s-a realizat decît atunci cînd nucleul a fost introdus în citoplasma unui ou nefecundat. Deci este clar că citoplasma influențează funcția nucleului, deși natura reglatorilor genelor nu este încă cunoscută. Concluzia că celula este o unitate morfo-funcțională este însă clară, deși noi am descris separat părțile componente ale celulei mergînd pînă la nivel molecular.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Austin S. A., Translational Regulation of Protein in Eukaryotes in „Essays in Biochemistry“, vol. 6, 79—120, 1982.
2. Benz M., Transient and developmental activation of heat shock genes, Trends Biochem. Sci., 10, 157—161, 1985.
3. Brown D. D., Gene expression in eukaryotes, Science, 211, 667—674, 1981.
4. Cooper D. N., Eukaryotic DNA methylation, Human Genet., 64, 315—333, 1983.

17. RETICULUL ENDOPLASMIC

17.1. ULTRASTRUCTURĂ ȘI COMPOZIȚIE CHIMICĂ

În secolul trecut s-au observat la microscopul optic granulații bazofile în neuroni (*substanța tigroidă* sau *corpusculii lui Nissl*), în hepatocit (zone sferice numite *corpui lui Berg*) și în pancreas (o zonă bazofilă cu striatii longitudinale numită *ergastoplasmă*, situată sub nucleu). S-a observat că aceste zone sînt bine reprezentate la animalele sătule și dispar în inaniție, ceea ce a sugerat rolul lor în sinteza proteinelor. Se știe acum că de fapt structurile descrise au la bază un sistem de membrane intracelulare cu ribozomi atașați (ceea ce dă bazofilia), a cărui ultrastructură a fost dezvăluită de microscopia electronică. *Porter* și colab. în 1945 au observat prima dată la microscopul electronic în celule cultivate o rețea de tuburi ce nu atingea ectoplasma, pe care au numit-o rețeaua *reticul endoplasmic* (RE).

RE este un sistem complex de membrane intracelulare organizate în tuburi și saci turtiți (cisterne), care străbate întreaga citoplasmă a celulei eucariote. Unele porțiuni ale acestei rețele au ribozomi atașați membranei și poartă numele de *RE rugos*, deoarece are aspect neregulat, dat de proeminarea ribozomilor în citoplasmă. Alte porțiuni ale RE sînt lipsite de ribozomi și se numesc *RE neted*. Membrana RE neted se află în continuitate cu membrana RE rugos, deși ca aspect general în RE rugos predomină cisternele, pe cînd RE neted este dispus mai ales ca o rețea de tuburi sau canale interconectate. RE rugos se continuă cu foiața externă a învelișului nuclear, iar lumenul RE cu spațiul perinuclear, pe cînd RE neted se întinde spre periferia celulei fără însă a atinge plasmalema (fig. 17.1).

Deși cele două porțiuni ale RE, rugos și neted, nu sînt separate printr-o graniță netă, ci prezintă interconexiuni morfologice și funcționale, există totuși o specializare a RE rugos în sinteza proteinelor (avînd ribozomii legați de membrană), iar a RE neted în sinteza lipidelor. De aceea RE neted este bine dezvoltat numai în celule specializate în sinteza lipi-

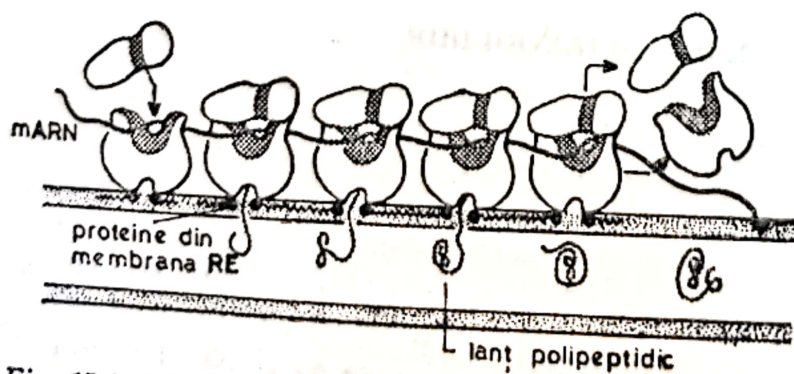


Fig. 17.1. Diagrama sintezei proteinelor de către polizomul atașat membranei RE rugos.

delor, în restul celulelor fiind slab reprezentat și în acest caz este numit *RE de tranziție* (în loc de RE neted).

O importanță deosebită în precizarea compoziției chimice și a funcțiilor RE au avut-o studiile biochimice după fracționarea celulei prin omogenizare și centrifugare diferențială. În cursul acestor operații are loc fragmentarea RE și fuziunea membranelor cu formarea unor vezicule numite *microzomi*. În aceștia se păstrează orientarea membranei RE din celulă; fața externă a microzomilor corespunde la fața citoplasmatică a RE, iar conținutul este identic cu cel din lumenul RE. Deci microzomii nu sînt organite celulare, ci fracțiunea subcelulară, obținută prin centrifugarea omogenatului celular, ce corespunde RE. Se pot obține separat microzomi rugoși și netezi, după cum se pot și desprinde ribozomii de pe membrana RE rugos.

Studiile pe microzomi au precizat compoziția chimică și funcțiile RE. Membranele RE conțin proteine și lipide în proporții aproximativ egale, existînd diferențe de compoziție între RE rugos și neted. Principala diferență o dă prezența numai în RE rugos a proteinelor numite *riboforine* identificate și purificate de *Kreibich, Sabatini* și colab. (*Kreibich și colab., 1978*). Acestea sînt proteinele care au rolul esențial în legarea ribozomilor de membrana RE. Ele mai pot avea rol și în transferul prin membrană al lanțului polipeptidic nascent; de asemenea s-a sugerat că avînd o configurație extinsă și formînd o rețea în membrana RE rugos, riboforinele conferă formă caracteristică cisternelor acestuia. Riboforinele fiind absente în RE neted, se înțelege de ce ribozomii nu sînt atașați acestei zone.

Caracteristic proteinelor din membrana RE este faptul că sînt glicoproteine ce străbat complet stratul dublu lipidic, iar grupările glucidice sînt situate pe fața luminală a membranei. Deci există o asimetrie a proteinelor, grupările glucidice fiind pe fața opusă citoplasmei. Prin aceasta lumenul RE prezintă asemănări cu spațiul extracelular, fiindcă și în cazul plasmalemei grupările glucidice sînt la exteriorul plasmalemei (pe fața opusă citoplasmei). Lipidele din membrana RE sînt în majoritate fosfolipide, cele majore fiind: fosfatidilcolina (45%), fosfatidiletanolamina (30%), fosfatidilserina (10%) și fosfatidilinozitolul (5%). Există puțin colesterol, iar acizii grași din fosfolipide sînt foarte nesaturați, ceea ce conferă o mare fluiditate membranei RE.

17.2. FUNCȚII SPECIFICE RE RUGOS

Avînd ribozomi atașați, *principală funcție a RE rugos constă în sinteza proteinelor*, și anume a proteinelor „de export”, ce sînt secretate de celule, precum și a proteinelor de membrană, destinate diferitelor membrane ale celulei. Se înțelege de ce RE rugos este foarte bine dezvoltat în celulele pancreasului exocrin (ce secretă enzime digestive), în plasmocite (care sintetizează imunoglobuline), în hepatocite (care produc albumina și alte proteine serice). De asemenea, avînd rol în biogeneza mem-

branelor, este bine dezvoltat în neuroni, care trebuie să-și întrețină „o suprafață mare de membrane” în prelungiri.

În unele celule se poate observa o aranjare ordonată a cisternelor RE rugos, cum este cazul pancreasului exocrin. Pe membranele RE se pot observa la microscopul electronic ribozomii dispuși în spirală sau rozete, ceea ce corespunde polizomilor atașați membranei.

Se cunosc detalii ale felului cum are loc sinteza proteinelor de către ribozomii atașați membranei RE. La microscopul electronic s-a observat că ribozomii se leagă prin subunitatea lor 60S, pe când cea 40S rămâne spre plasmalemă, rezultând aspectul de „om de zăpadă” (fig. 17.1.). Se pare că oricare din ribozomii 80S pot să se lege de membrana RE rugos, iar această legare se face sub forma polizomului. Decisivă pentru legare este prima parte a lanțului polipeptidic nascent (care începe să se formeze în citosol, când ribozomul s-a legat de mRNA și a început elongarea). Acest prim segment al lanțului polipeptidic poartă numele de *semnal de inserție* și constă din primii 18—30 aminoacizi de la capătul N-terminal. Deci legarea polizomului devine posibilă când asemenea secvențe semnal „ies din ribozomi”, ceea ce înseamnă că lanțul polipeptidic are deja 50—70 resturi de aminoacizi (30—40 fiind în interiorul ribozomului). *Sabatini, Tashiro și Palade* (1966) au arătat prima dată că ribozomii se leagă de membrana RE prin subunitățile lor mari ce conțin lanțurile nascente, iar *Blobel și Dobberstein* (1975) au demonstrat existența semnalului de inserție.

O caracteristică a semnalelor de inserție, comună tuturor proteinelor produse în RE rugos, este prezența lângă capătul N-terminal a 1—2 resturi încărcate pozitiv, după care urmează o regiune hidrofilă cu o structură de α -helix (potrivită inserării în stratul dublu lipidic al membranei RE). Primii aminoacizi cu sarcini pozitive par să favorizeze asocierea inițială a lanțului nascent cu grupările polare încărcate negativ ale fosfolipidelor membranei. Apoi capătul semnalului rămâne în citoplasmă, în timp ce restul secvenței semnal (porțiunea mijlocie hidrofobă) se inseră în membrană. Deci semnalul ia forma unei bucle („the loop model”). După alt model semnalul trece complet în lumenul RE.

În continuare întreaga sinteză se desfășoară pe membrana RE rugos, iar lanțul polipeptidic este „transferat vectorial” prin membrană pe măsura sintezei. Reiese importanța legării corecte a ribozomului de membrană. Se pare că la aceasta cooperează mai multe proteine. Imediat ce lanțul nascent începe să iasă dintr-un ribozom aflat încă în citosol, de secvența semnal se leagă un complex macromolecular de 11S (cu 6 polipeptide de 9.000—72.000 daltoni și ARN 7S) numit particula de recunoaștere a semnalului („signal recognition particle”, SRP). Aceasta mediază interacțiunea dintre ribozom și membrana RE, dar și oprește elongarea până la legarea ribozomului. Complexul format de SRP și semnalul de inserție este recunoscut de un receptor din membrana RE numit *proteina doc* („docking protein”) de 72.000 daltoni, care facilitează legarea polizomului. La fel, ribozomul însuși este recunoscut de către *ribosomele* I și II, proteine majore din membrana RE rugos, cu greutatea de 65.000 și 63.000 daltoni. Toate aceste proteine apar drept componente ale așa-numitului „aparat de transfer vectorial”. O altă componentă a sa este reprezentată de *peptidaza semnalului*, enzimă din RE ce sintetizează

secvența semnal. Peptidaza este localizată pe fața luminală a membranei RE și pentru a se atinge punctul de clivare lanțul polipeptidic trebuie să aibă cel puțin 80—90 aminoacizi (40 în ribozomi, 20 în membrană și cei 18—30 în semnal). De obicei scindarea se produce înainte ca sinteza proteinei să se fi terminat. Deci semnalul de inserție ar fi necesar numai pentru legarea ribozomilor de membrană. După aceea polizomul este menținut de lanțul polipeptidic ce se „scurge ca un șarpe” în lumenul RE, ca și de interacțiunea cu riboforinele.

Procesul de transfer vectorial înlătură necesitatea ca o proteină globulară să fie trecută prin stratul dublu lipidic, ceea ce ar fi foarte dificil. În același timp acest proces face posibilă segregarea proteinelor de secreție (care trec în lumenul RE și apoi vor urma calea secreției celulare descrisă în cap. 19) de enzimele lizozomale, ce rămân atașate feței luminală a membranei RE sau de proteinele de membrană. În cazul acestora lanțul polipeptidic rămâne încorporat în membrana RE deoarece în lanțul polipeptidic apare o secvență numită *semnal de oprire a transferului vectorial* („halt” sau „stop”) care determină reținerea proteinei în stratul dublu lipidic (vezi trecere în revistă Sabatini și colab., 1982). În continuare lanțul polipeptidic poate rămâne în membrana RE sau poate fi transferat altei membrane celulare: prin difuziune (de pildă pot ajunge proteine în membrana nucleului ce se continuă cu cea a RE), sau pe calea veziculelor se desprind din RE pentru a fuziona cu alte membrane (aparat Golgi, plasmalemă). În sfârșit, transferul vectorial face posibil adaosul grupărilor glucidice pe lanțul polipeptidic.

Glicozilarea este o funcție specifică a RE rugos și se produce pe măsură ce are loc elongarea. Glicozilarea deosebește proteinele sintetizate în RE de cele din citosol care nu sînt glicozilate. Adaosul grupărilor glucidice are loc pe fața luminală a membranei RE. De obicei se atașează lanțuri oligozaharidice pe gruparea NH_2 de la o asparagină

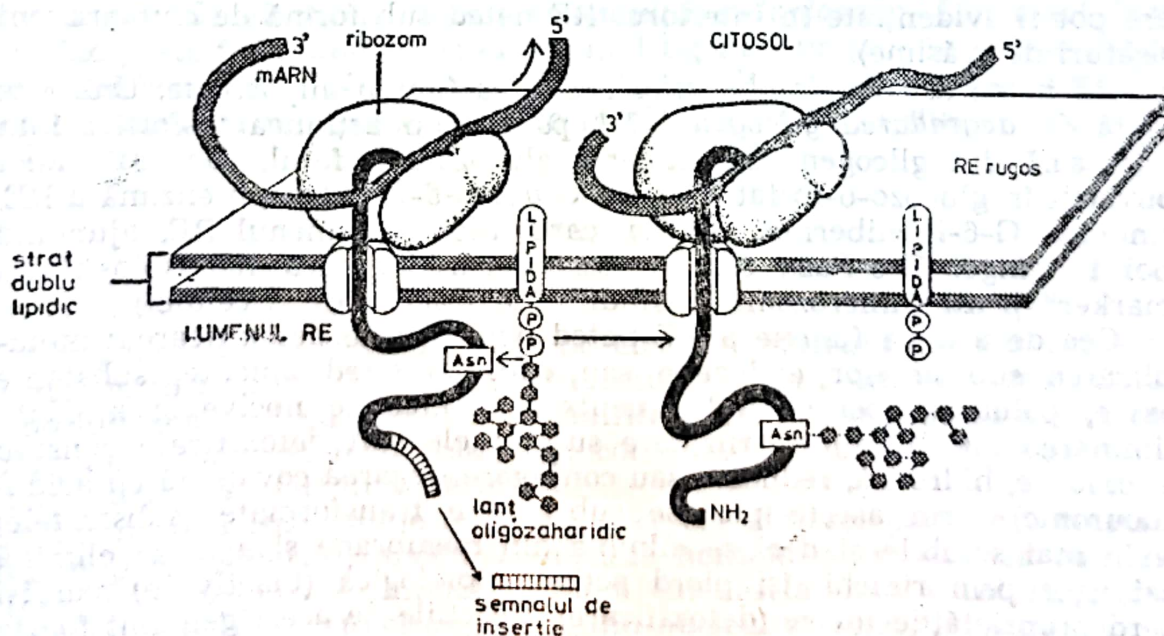


Fig. 17.2. Diagrama glicozilării efectuate în RE rugos (după Alberts și colab., 1983).

(Asn) din lanțul polipeptidic. Lanțul oligozaharidic este asamblat pe o moleculă lipidică numită *dolicol*, de care se află legat printr-o legătură macroergică pirofosforică. Asamblarea pe *dolicol* se face din monozaharide aduse una câte una de nucleotidele „cărăuși” (UDP-glucoză, UDP-galactoză, GDP-manoză). În final întreg lanțul oligozaharidic este transferat pe Asn prin acțiunea *glicoziltransferazei*, enzimă legată de membrana RE (fig. 17.2.).

Membrana RE mai efectuează și alte modificări ale lanțului polipeptidic: scindări proteolitice, formări de legături disulfidice, modificări ale lanțurilor laterale ale aminoacizilor.

De remarcat că descărcarea sau transferul vectorial al lanțului polipeptidic este un proces general, fiind întâlnit și la bacterii (sinteza proteinelor periplasmice), precum și la mitocondrii și cloroplaste (ribozomii fiind atașați de membranele interne ale acestora).

17.3. FUNCȚII SPECIFICE RETICULULUI ENDOPLASMIC NETED

RE neted fiind implicat în *biosinteza lipidelor*, va fi foarte dezvoltat în acele celule în care sinteza lipidelor este foarte activă. Astfel sînt celulele din corticosuprarenală și gonade, care sintetizează hormoni steroizi, precum și celulele din mucoasa intestinală cu rol în absorbție. Aceste celule absorb din lumenul intestinal amestecul de acizi grași, monogliceride și digliceride ce rezultă din lipidele alimentare scindate de lipaza pancreatică. În reticulul endoplasmic foarte dezvoltat al celulelor intestinale, din substanțele absorbite se sintetizează trigliceride, care pot fi evidențiate în interiorul RE neted sub formă de chilomicroni (picături de grăsime).

RE neted al celulelor hepatice are două funcții importante. Una este legată de *degradarea glicogenului hepatic*. Sub acțiunea fosforilazei în citoplasmă din glicogen este eliberat glucozo-1-fosfatul, care este apoi convertit în glucozo-6-fosfat (G-6-P). *Glucozo-6-fosfataza*, o enzimă a RE, scindează G-6-P eliberînd glucoza, care trece în lumenul RE, ajungînd apoi în sînge. G-6-Paza este o enzimă caracteristică RE (folosită ca „marker” pentru microzomi în studiile de fracționare a celulei).

Cea de a doua funcție a RE neted hepatic este detoxificarea: metabolizarea substanțelor endogene sau exogene (medicamente, substanțe toxice, poluanți), pentru a le „neutraliza” efectele nocive și a ușura eliminarea lor. Reacțiile prin care substanțele sînt detoxificate constau în: oxidare, hidroliză, reducere sau conjugare (legarea covalentă cu acidul glucuronic). Prin aceste procese substanțele transformate (substratele) devin mai solubile și deci se elimină din membrane și apoi se elimină mai ușor prin rinichi, își pierd acțiunea biologică (inactivare) sau își pierd proprietățile toxice (detoxificare). Reacțiile de acest gen sînt foarte importante și în metabolizarea sărurilor biliare, a steroizilor (hormoni, colesterol), degradarea hemoglobinei, precum și în *metabolismul medica-*



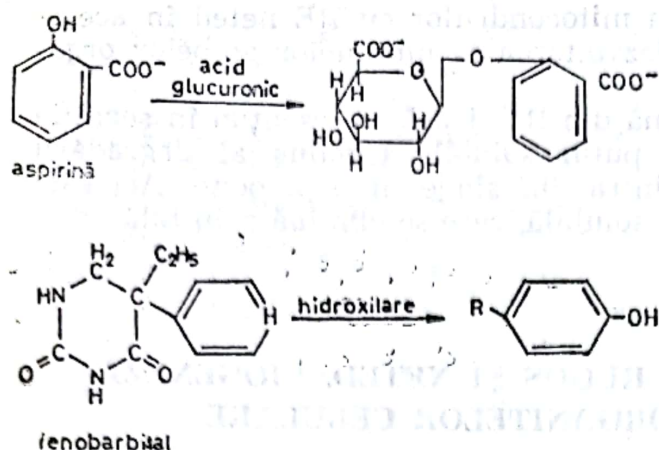
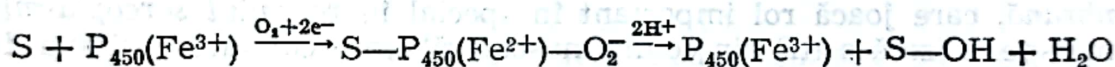
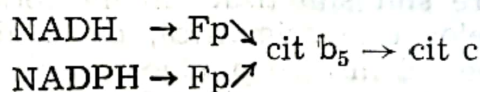


Fig. 17.3. Exemple de reacții de metabolizare a unor medicamente în RE neted.

substanțe: NADPH și oxigen molecular, enzimele fiind numite „oxidaze cu funcțiuni mixte” („mixed function oxidases”). Enzima principală este citocromul P_{450} , o hemoproteină ce are maximumul de absorbție al luminii la 450 nm. Această enzimă leagă atât substratul, cât și O_2 și trece unul din atomii de oxigen pe substrat (sub forma grupei OH), iar cel de al doilea atom de oxigen se combină cu H^+ pentru a forma apa (este numită oxidază cu funcțiuni mixte fiindcă necesită doi acceptori diferiți, câte unul pentru fiecare atom de oxigen).



Electronii sînt furnizați citocromului P_{450} de la NADPH prin lanțul transportor de electroni asociat reticulului endoplasmic. Din acest lanț mai fac parte flavoproteine și citocromul b_5 ; flavoproteinele pot să transfere electroni de la NADH sau NADPH la citocromul b_5 . Citocromul c poate acționa ca un acceptor de electroni de la cit. b_5 redus, acesta fiind stabilizat:



Enzimele lanțului transportor de electroni microzomal sînt proteine legate de membrană. Hidroxilările efectuate asupra tuturor substratelor liposolubile au rol nu numai în detoxifiări, ci și în biosinteza colesterolului, hormonilor steroizi (estradiol, cortizol), acizilor biliari, altor substanțe cu grupări OH în moleculă.

Membrana RE conține enzimele necesare sintezei parțiale a colesterolului plecînd de la squalen. Biosinteza hormonilor steroizi în corticosuprarenală și gonade implică clivarea catenei laterale a colesterolului și hidroxilarea unor atomi de carbon din nucleul steroid. Clivarea catenei laterale și hidroxilarea C11 are loc în mitocondrii (care în glandele ce produc steroizi au citocromi din clasa P_{450}), dar hidroxilarea C21 este

mentelor (de exemplu glucurono conjugarea aspirinei sau hidroxilarea fenobarbitalului) (fig. 17.3).

Procese de detoxificare au loc în special în ficat, dar se întîlnesc și în alte celule și, de asemenea, enzime asemănătoare s-au identificat și la procariote.

Cele mai multe reacții de toxicare sînt oxidări efectuate de un sistem enzimatic particular microzomilor, ce utilizează drept substrat două

realizată în RE neted. Cooperarea mitocondriilor cu RE neted în aceste celule glandulare se reflectă în dezvoltarea membranelor ambelor organe.

Glucuroniltransferaza, o enzimă din RE, joacă rol esențial în secreția bilirubinei. Bilirubina indirectă, puțin solubilă (produs al degradării hemului în special în fagocite), intră din sânge în hepatocite. Aci este transformată în bilirubină directă, solubilă, care se elimină prin bilă.

17.4. FUNCȚII COMUNE RE RUGOS ȘI NETED. BIOGENEZA MEMBRANELOR ȘI ORGANITELOR CELULARE

1. RE este un „*aparat circulator intracitoplasmatic*” vehiculând în întreaga celulă foarte multe substanțe. Pe lângă transportul substanțelor prin lumenul RE, se consideră că fluiditatea membranei joacă rol important permițând fluxul, difuziunea, în planul membranei, a multor substanțe, inclusiv proteine și lipide, care pot fi apoi repartizate altor compartimente celulare: membrana nucleului, aparatul Golgi etc.

2. Străbătând întreaga citoplasmă, RE poate juca rol de *suport mecanic* al citoplasmei, dar și de *compartimentare* a sa.

3. Membrana RE mediază *schimbările* dintre matricea citoplasmatică și lumenul reticulului, atât prin difuziune cât și prin transport activ. Se consideră că există *gradientele ionice transmembranare* și *potențial de membrană*, care joacă rol important în special în *reticulul sarcoplasmic* (forma specializată a RE din celula musculară), care conduce excitația de la plasmalema la miofilamente.

4. *Sinteza fosfolipidelor* are loc prin enzime localizate în membrana RE, având centrul activ orientat spre citosol, de unde vin precursorii: acil-CoA și glicerolfosfatul. Din doi acizi grași și glicerol-P se assemblează o moleculă de acid fosfatidic. Acesta este încorporat în monostratul citoplasmatic al membranei RE și este apoi supus modificării la capete spre a genera celelalte fosfolipide de membrană (cu excepția cardiolipinei și fosfatidilglicerolului care sînt sintetizate în membranele mitocondriale). Deci sinteza fosfolipidelor este asimetrică, ea se desfășoară în monostratul citoplasmatic. De aci însă se produce „flip-flop”-ul (vezi cap. 6), probabil sub acțiunea unei proteine, fiindcă altfel „flip-flop”-ul este un eveniment rar.

5. *Biogeneza membranelor și a organitelor celulare* este o funcție esențială a RE. Acesta poate fi considerat ca „*fabrica de membrane*” a celulei eucariote. S-a văzut că atât proteinele cât și lipidele de membrană se produc în membrana RE. Pe de altă parte enzime destinate organitelor celulare (lizozomi, peroxizomi) sînt și ele sintetizate în RE. Deși componentele ce rămîn după sinteză în membrana RE pot ajunge la unele membrane prin difuziune în planul membranei, majoritatea componentelor organitelor celulare ajung la acestea prin *vezicule de transport*. Acestea se desprind prin înmugurirea și apoi fuziunea unor părți din RE, fiind formate din membrana RE ce include o parte din lumen cu întreg

conținutul acestuia. Apoi veziculele se deplasează spre alte organite celulare „țintă” (aparat Golgi sau spre plasmalemă; prin fuziune cu acestea componentele membranei veziculei devin încorporate în membrana compartimentului „țintă”, pe cînd conținutul ajunge în lumenul acestor compartimente (sau în cazul fuziunii cu plasmalema este vărsat la exterior).

Deci în mod continuu membrana RE crește prin sinteza componentelor sale (proteine și lipide), apoi se fragmentează generînd vezicule de transport pe care le expediază altor organite sau le transmit la plasmalemă. Se înțelege deci că RE joacă rol cheie în biogeneza

tuturor membranelor celulare. Totodată, ca urmare a fisiunilor continue de membrane în care se păstrează orientarea (luminală sau citoplasmatică) a componentelor membranelor, se creează în celula eucariotă *spații echivalente topologic*: spațiul perinuclear, lumenul RE, lumenul veziculelor de transport al aparatului Golgi, interiorul lizozomilor, al veziculelor de secreție și exteriorul celulei (fig. 17.4.).

În același timp, avînd în vedere modul asimetric în care se desfășoară sinteza lipidelor și a proteinelor (glicozilarea) în RE se înțelege de ce asimetria este apoi transmisă tuturor membranelor celulare prin veziculele de transport.

Dintre organitele celulare mitocondriile fac excepție în privința biogenezei membranelor, prin faptul că ele primesc fosfolipidele (cele pe care nu le pot sintetiza) nu prin vezicule de transport, ci prin *proteine de transfer a fosfolipidelor*. Acestea sînt proteine solubile din citosol care leagă specific cite o moleculă de fosfolipidă pe care o transportă de la membrana RE la mitocondrii, unde fosfolipida este cedată membranelor mitocondriale. Proteinele din mitocondrii sînt numai în mică parte sintetizate în aceste organite (vezi cap. 22), majoritatea sînt produse de polizomii din citosol. Ele sînt trecute prin membranele mitocondriale prin transfer direct (fără vezicule), în care anumite secvențe servesc drept „semnale de inserție”.

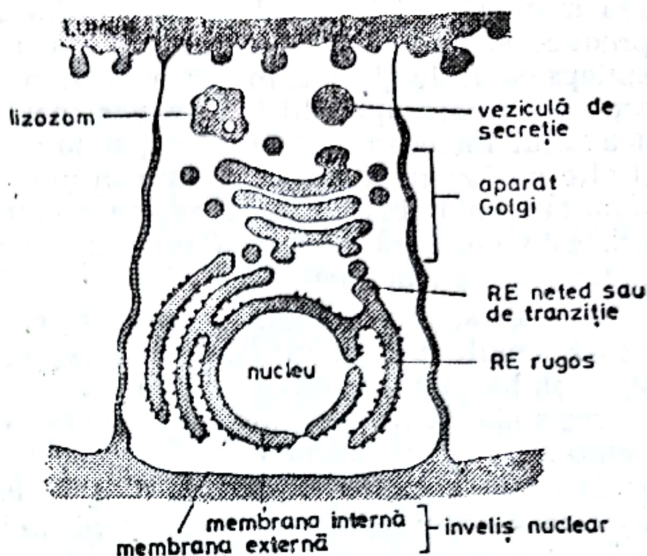


Fig. 17.4. Schema unei celule cu spațiile echivalente topologic indicate în gri (după Alberts și colab., 1983).

17.5. APLICAȚII MEDICALE

O caracteristică a RE neted este proliferarea sa marcată în funcție de necesitățile crescute de metabolizare a unor substanțe străine. De pildă, administrarea unor medicamente ca fenobarbitalul induce prolifera-



rea marcată a RE neted care se dublează după câteva zile. Aceasta se produce și la om în cazul administrării fenobarbitalului în tratamentul epilepsiei. Inducția enzimelor microzomale sub acțiunea medicamentelor are importante aplicații în practica medicală. Proliferarea RE sub acțiunea unui medicament crește capacitatea RE de a metaboliza mai rapid și alte medicamente metabolizate în microzomi. De aceea dacă se tratează simultan un bolnav cu mai multe medicamente, ce se metabolizează în RE, este necesară ajustarea precisă a dozelor administrate spre a evita ineficacitatea tratamentului.

În același timp însă, trebuie să se țină seama că dacă se administrează simultan două medicamente ce se metabolizează în RE neted, fiecare inhibă metabolizarea celuilalt. Același efect de inducție a enzimelor microzomale îl are și alcoolul. Ingestia cronică de alcool accelerează metabolizarea medicamentelor (dispar mai rapid în sânge), în schimb ingestia acută de alcool o inhibă. De aci toleranța mare în general a alcoolului la sedative și intoleranța în alcoolismul acut. Cunoașterea acestor particularități este importantă în administrarea de medicamente ce se metabolizează în RE.

Inducția enzimelor microzomale reprezintă un fenomen ce capătă importanță tot mai mare. S-a descris de pildă și la personalul din sălile de operație sau chiar la 3 săptămâni după operații la care s-a folosit anestezie generală cu halotan sau chiar numai anestezie spinală (aceasta sugerează că și alți factori asociați actului operator, pe lângă anestezic, produc inducția RE).

În mod paradoxal un mecanism ce apără organismul de toxice se poate întoarce împotriva omului. Aceasta se produce și prin faptul că agenții carcinogeni (metilcolantren) produc inducția unui citocrom P_{448} care activează carcinogeneza.

RE prezintă aspecte diferite în raport de starea funcțională a celulei. De exemplu în hepatocit, când sinteza proteinelor este maximă, predomină RE rugos, care ocupă toată citoplasma. Dimpotrivă, la un animal flămând predomină RE neted. Aceste aspecte au importanță și în practica histopatologică. Astfel, când predomină RE neted, numărul ribozomilor fiind mic și cantitatea de ARN mică, citoplasma se colorează cu coloranți bazi în roșu, aspect numit eozinofilie citoplasmatică. Eozinofilia citoplasmei este unul din caracterele celulei adulte (împreună cu nucleul mic și citoplasmă abundentă). Dimpotrivă, la celula tânără sinteza de proteine fiind intensă, predomină RE rugos, există mult ARN, citoplasma se colorează cu coloranți acizi în albastru, aspect numit bazofilie citoplasmatică. Cu cât celula este mai tânără, nucleul este mai mare, citoplasma este mai redusă și mai puternic bazofilă, acestea fiind și criterii de identificare a celulelor maligne.

În sfârșit, tot aplicație practică are și faptul că toate leziunile toxice într-un organ sau țesut atacă RE. După cum lipsa O_2 afectează mitocondriile, tot așa orice toxic (otravă sau medicament) modifică reticulul endoplasmic, ceea ce permite stabilirea diagnosticului de intoxicație în practica medico-legală.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVA

1. Blobel G., Intracellular protein topogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 1496—1500, 1980.
2. Blobel G., Dobberstein B., Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane bound ribosomes of murine myeloma, *J. Cell Biol.*, 67, 835—851, 1975.
3. Farquhar M. G., Bergeron J. J. M., Palade G. E., Cytochemistry of Golgi fractions prepared from rat liver, *J. Cell Biol.*, 60, 8—25, 1974.
4. Kreibich G., Ulrich B. L., Sabatini D. D., Proteins of rough microsomal related to ribosome binding. I. Identification of ribophorins I and II, membrane proteins characteristic of rough microsomes, *J. Cell Biol.*, 77, 464—487, 1978.
5. Loft S., Boel J., Kyst A., Rasmussen B., Hansen S. H., Dössing M., Increased hepatic microsomal enzyme activity after surgery under halothane or signal anesthesia, *Anesthesiology*, 62, 11—16, 1985.
6. Novikoff A. B., The endoplasmic reticulum: a cytochemist's view (A review), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 2781—2787, 1976.
7. Rubin E., Lieber C. S., Hepatic microsomal enzymes in man and rat: induction and inhibition by ethanol, *Science*, 162, 690—691, 1981.
8. Sabatini D. D., Kreibich G., Morimoto T., Adesnik M., Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles, *J. Cell Biol.*, 92, 1—22, 1982.
9. Sabatini D. D., Tashira Y., Palade G. E., On the attachment of ribosomes to microsomal membranes, *J. Mol. Biol.*, 19, 503—524, 1966.
10. Schenkman J. B., Jansson I., Robie-Suh K., The many roles of cytochrome b₅ in hepatic microsomes, *Life Sci.*, 19, 611—624, 1976.

18. APARATUL GOLGI. ULTRASTRUCTURA ȘI FUNCȚII

A fost descris la sfârșitul secolului trecut de către *Camillo Golgi* ca un „aparat reticular intern“, datorită aspectului de rețea perinucleară observat în ganglionul spinal de pisică, dar multă vreme a rămas pentru unii un artefact. Abia după 1954 prin microscopie electronică s-a pus capăt disputei dovedindu-se realitatea acestui organit care a mai fost numit *complexul Golgi*, apoi prin tehnici combinate biochimice și morfologice s-au clarificat aspectele funcționale.

Aparatul Golgi este format din trei elemente principale:

a) Partea esențială este un număr variabil de *saci turtiți* (sau *cisterne aplatizate*), adeseori ușor curbați (formă de cupă) așezați lângă nucleu și centrioli. Numărul de saci este variabil în funcție de celulă, în majoritatea cazurilor 5—11. Fiecare sac poate fi comparat cu o farfurie avînd partea centrală mai subțire și periferia mai dilatată. Dacă au formă curbată, de obicei fața convexă privește spre nucleu și RE rugos, cea concavă spre suprafața celulei. Fața convexă a aparatului Golgi este numită fața *cis* (*proximală*, apropiată de nucleu și RE, sau de formare), iar fața concavă este cea *trans* (*distală*, sau de maturare). Este preferabilă denumirea de *cis* și *trans*, fiindcă nu întotdeauna sacii sînt curbați, iar localizarea în celulă variază.

La plantele superioare apar cîteva sute de saci, dispuși sub forma unor aparate multiple Golgi răspîndite prin citoplasmă (denumirea veche la plante era de dictiozom).

b) Între fața proximală și nucleu se observă vezicule mici de ordinul Å, care se desprind din reticulul endoplasmic aflat în vecinătate și apoi fuzionează cu sacii proximali. Prin aceste *vezicule de tranziție* materialele sintetizate în RE sînt vărsate în sacii aparatului Golgi. Membranele veziculelor fuzionează cu membrana sacilor proximali, iar conținutul veziculelor se varsă în cavitatea sacilor Golgi.

c) De la extremitatea sacilor, ca și din sacii distali, se desprind vezicule mari, de 0,3—3 μm; majoritatea lor sînt reprezentate de *vezicule de secreție*, care conțin proteinele secretate de celulă, maturate în aparatul Golgi și care vor fi eliminate la exterior prin exocitoză. De la periferia sacilor se formează însă și *lizozomii primari*.

Regiunea din celulă în care se află aparatul Golgi este aglomerată, cu multe vezicule și chiar zona citoplasmei în care este inclus aparatul Golgi este mai densă decît restul matricii citoplasmatice și are aspect fibrilar-granular.

S-a descris un proces de maturare al sacilor din aparatul Golgi. Ei s-ar forma din RE pe fața cis, apoi componentele lor se deplasează spre fața trans, unde sacii Golgi se fragmentează în veziculele de secreție, ce vor fi eliminate din celulă prin exocitoză. Dacă aparatul Golgi are o polaritate distinctă, în schimb este discutată trecerea succesivă a componentelor dintr-un sac în altul, pe direcția trans, deși mulți autori presupun aceasta.

Există deosebiri morfologice între zona cis și trans a aparatului Golgi. Sacii din zona cis au membrana mai subțire, de circa 6 nm (ca și grosimea membranei RE), pe când cei din zona trans au membrane de 10 nm (de grosimea plasmalemei). Prin metode histochemice și biochimice s-a evidențiat localizarea distinctă a enzimelor în sacii Golgi. Unele sînt dispuse în zona trans, altele în zona cis. Este interesant că enzime caracteristice plasmalemei (5'-nucleotidaza și adenilatciclaza) se află la periferia sacilor Golgi în regiunea mai dilatată. Există deci o heterogenitate enzimatică a sacilor Golgi nu numai pe direcția polarității, ci și în aceeași cisternă la centru față de periferie, după cum s-a demonstrat de către Palade, Farquhar și colab. (trecere în revistă Farquhar și Palade, 1981).

Funcțiile aparatului Golgi pot fi rezumate astfel.

1. *Funcții legate de secreția celulară:* concentrarea produșilor sintetizați în RE, prelucrarea lor prin procese biochimice și sinteza de noi componente, sortarea sau segregarea produșilor de secreție, ambalarea lor sub formă de vezicule și livrarea acestora spre plasmalemă.

a. *Concentrarea produșilor de secreție*, sintetizați în RE se face, fie în veziculele de secreție ce se desprind pe fața trans, cum este cazul pancreasului exocrin (vezi cap. 10), fie, în majoritatea celulelor, la periferia sacilor Golgi (în regiunile mai dilatate ale acestora). Concentrarea rezultă din formarea unor agregate prin interacțiuni electrostatice între produșii de secreție și complexe proteine-polizaharide cu sarcină contrară; rezultă scăderea activității osmotice și ieșirea apei din compartiment. Ionii de Ca^{2+} pot și ei participa la interacțiuni electrostatice.

b. *Prelucrarea biochimică a produșilor de secreție* implică mai multe procese. *Conversia proproteinelor în proteine de secreție* se realizează prin scindarea unor porțiuni din lanțul polipeptidic: din proalbumină rezultă albumină, din proinsulină sau proparathormon rezultă insulină și, respectiv, parathormon etc. Enzimele proteolitice nu au fost încă izolate și în unele cazuri se pare că ele sînt ambalate în veziculele de secreție și acolo se produce proteoliza.

Glicozilarea terminală a proteinelor este o funcție majoră a aparatului Golgi. Lanțurile oligozaharidice, care se găsesc grefate pe Asn încă din RE, sînt la început scindate, îndepărtîndu-se toate resturile de glucoză și o parte din cele de manoză de la periferia oligozaharidului. Aceasta o face α -manozidaza, enzimă caracteristică aparatului Golgi. După aceea se adaugă alte resturi glucidice, din cele aduse de nucleotide „cărăuși” (UDP, CMP etc.) prin glicoziltransferaze localizate în aparatul Golgi. În acest fel se ajunge la structura finală a glicoproteinelor de secreție.

S-au precizat și detalii ale glicozilării efectuate în aparatul Golgi. Astfel, îndepărtarea resturilor de manoză se face în sacii Golgi cis; adao-

sul N-acetilglucozaminei are loc în sacii centrali, pe cînd adaosul resturilor de galactoză se face în sacii trans (Schatz, 1985).

Glicozilarea glicolipidelor în special a cerebrozidelor și ganglioazelor (foarte activă în creier și rinichi) se realizează prin glicoziltransferaze specifice.

Sulfatarea, ca și glicozilarea terminală, se petrece exclusiv în aparatul Golgi, prin sulfotransferaze, care transferă grupări sulfat pe glicoproteine, proteoglicani, glicolipide (de pildă din cerebrozide rezultă sulfatide).

Prin reacțiile amintite aparatul Golgi joacă rolul esențial în sinteza mucopolizaharidelor (proteoglicanilor) și ganglioazelor.

c. Aparatul Golgi realizează și sortarea sau segregarea produșilor de secreție (în special separarea lor de enzimele lizozomale) și ambalarea lor în membrane compatibile de a fuziona cu plasmalema. Veziculele de secreție au compoziția membranei diferită de cea a sacilor Golgi și mai apropiată de plasmalemă.

Prin toate funcțiile de mai sus aparatul Golgi joacă rol central în secreția celulară; el nu este o simplă „haltă” sau „stație de imbuteliere”, ci intervine activ în modificarea conținutului produșilor elaborați în RE înainte de a-i livra spre plasmalemă.

2. *Biogeneza lizozomilor* implică întîi segregarea enzimelor lizozomale de ceilalți produși de secreție. În aceasta se pare că un rol important revine faptului că enzimele lizozomale au ca grupări glucidice terminale manoză-6-fosfatul. Acest marker este recunoscut de un receptor specific din membrana RE și a aparatului Golgi și determină segregarea enzimelor lizozomale în zona trans, de unde se desprind vezicule îmbrăcate în clatrină. Acestea pierzîndu-și îmbrăcămintea devin lizozomi primari.

Novikoff și colab. (1977) au propus că enzimele lizozomale sînt sintetizate în anumite cisterne ale RE și vacuole de condensare ce ar forma așa-numitul GERL („Golgi-associated Endoplasmic Reticulum from which Lysosomes arise”). Astfel s-ar șunta trecerea enzimelor lizozomale prin sacii Golgi. Dar nu există dovezi pentru aceasta.

3. *Dirijarea traficului de membrane* (sub forma veziculelor) în celulă este o altă funcție majoră a aparatului Golgi. Pe de o parte este o stație importantă pe calea secreției celulare, primește vezicule din RE, le modifică (atît conținutul cît și membrana) și apoi expediază vezicule de secreție spre plasmalemă, care prin exocitoză varsă produși de secreție în afara celulei (vezi și cap. 19). Pe de altă parte aparatul Golgi expediază veziculele cu enzime lizozomale ce devin lizozomii primari.

Dar mai există și alte procese de transport prin vezicule în celulă în care aparatul Golgi joacă rol esențial. *Reciclarea membranelor* a fost sugerată de Palade încă din 1959, ca o reutilizare a componentelor plasmalemei de către celulă legată de secreția celulară. Din moment ce prin exocitoză se adaugă plasmalemei componentele din membrana veziculelor de secreție, trebuie îndepărtată o porțiune din plasmalemă pentru ca suprafața să rămînă constantă. Aceasta se realizează prin endocitoză, din plasmalemă desprinzîndu-se vezicule ce aduc înapoi în celulă componente ale membranei ce fuseseră folosite pentru exocitoză. În acest fel celula refolosește componentele membranelor. Totodată endocitoza

introduce în celulă materiale de la exterior. Reciclarea membranelor este un proces foarte important, calitativ și cantitativ; se întâlnește în toate celulele specializate în secreție, precum și în macrofage și neuroni (reutilizarea membranei, veziculelor sinaptice). În reciclare veziculele ajung înapoi de la plasmalemă la sacii Golgi, dar nu și la RE. Procesul este energodependent.

În principiu reciclarea poate aduce la aparatul Golgi proteine de membrană, inclusiv enzime și receptori, ce pot fi modificate, separate (reglicozilate, sulfatate etc.) și refolosite; de asemenea molecule informaționale din exterior (hormoni, catecolamine) pot ajunge la aparatul Golgi influențând metabolismul celulei (Farquhar și Palade, 1981).

În sfârșit, există date ce arată rolul aparatului Golgi în *biogeneza membranelor*. Proteine integrale de membrană (sintetizate în RE rugos) sosesc pe calea veziculelor la aparatul Golgi (probabil fuzionează de preferință cu porțiunea periferică, mai dilatată, a sacilor Golgi); apoi după maturare (glicozilare terminală) se desprind tot de aici vezicule ce livrează plasmalemei proteine (și lipide).

S-au descris și polizomi liberi în zona specială de citoplasmă în care este inclus aparatul Golgi. Acești polizomi (deși nu sînt legați de membrană) ar avea rol de a sintetiza proteine specifice din membrana aparatului Golgi (Morré, 1976). Alte aspecte ale rolului aparatului Golgi în biogeneza membranelor sînt trecute în revistă de Morré (în ref. Benga, 1985, vol. III).

Deci există mai multe tipuri de trafic intracelular de membrane în multiple direcții, care toate implică aparatul Golgi ca o stație centrală. Ca și în cazul secreției celulare și în traficul membranelor aparatul Golgi nu este doar o „haltă” sau „dispecer”, ci este o complexă „companie de producție și transporturi”, în care „containerizarea și direcționarea” este numai un aspect, fiindcă modificarea de structură a componentelor transportate este esențială. Merită subliniat în concluzie caracterul heterogen al aparatului Golgi, chiar în același sac, ale cărui porțiuni dilatate sînt „rampele” la care vin și de la care pleacă veziculele în direcții bine definite. Este surprinzător (și mecanismele încă nu sînt clare) cum se poate menține individualitatea tuturor membranelor celulare (exprimate în diferențe de compoziție chimică inclusiv între diferitele feluri de vezicule) în ciuda repetatelor fuziuni de membrane. Mecanismele prin care se menține specificitatea diferitelor compartimente celulare și ale direcționării membranelor altor componente în endocitoză și exocitoză reprezintă azi una dintre cele mai complexe arii de cercetare ale biologiei celulare și moleculare.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Balch W. E., Dunphy W. G., Braell W. A., Rothman J. E., Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine, *Cell*, 39, 405—416, 1984.

2. Elder J. H., Morré D. J., Synthesis *in vitro* of intrinsic membrane proteins by free, membrane-bound, and Golgi apparatus-associated polyribosomes from rat liver, *J. Biol. Chem.*, 251, 5054—5065, 1976.
3. Farquhar M. G., Palade G. E., The Golgi apparatus (complex) (1954—1981) — from artifact to center stage, *J. Cell Biol.*, 91, 77—103, 1981.
4. Novikoff A. B., Novikoff F. M., Cytochemical contributions to differentiating GERL from the Golgi apparatus, *Histochem. J.*, 9, 525—551, 1977.
5. Rothman J., The Golgi apparatus: two organelles in tandem, *Science*, 213, 1212—1219, 1981.

19. SECREȚIA CELULARĂ

Secreția este una dintre activitățile multor celule. La unicelulare este o modalitate de a elimina deșeurile. La plantele superioare și la animale multe din structurile extracelulare sînt produse prin secreție: toate componentele matricii extracelulare, inclusiv, fibrele proteice pe care se depun sărurile de Ca în os, cuticula de la artropode. Pe lângă aceasta unele celule sînt specializate în secreție: celulele glandelor endocrine și exocrine secretă hormoni și enzime, celulele mucoase din căile respiratorii și tractul digestiv secretă glicoproteine și mucopolizaharide, unii neuroni secretă neurotransmițători. Hepatocitul secretă albumină și alte proteine serice.

Sinteza și secreția enzimelor digestive de către porțiunea exocrină a pancreasului a fost primul model de secreție celulară studiat prin metode moderne, de către Palade și colab., în special Jamieson. Autorii au injectat aminoacizi radioactivi la cobai și după 3 minute au injectat o doză mult mai mare de aminoacizi nemarcați pentru a opri captarea radioactivității (experiență „pulse-chase”). S-au sacrificat animalele la diferite intervale de timp; după cîteva minute radioactivitatea s-a găsit în reticulul endoplasmic al celulelor pancreatice; după 20 minute s-a găsit în aparatul Golgi și veziculele vecine; după 2 ore s-a găsit în



Fig. 19.1. Calea secreției celulare.

veziculele de secreție (numite și *granule de zimogen* fiindcă conțin enzime inactive). Aceste experiențe au demonstrat secvența prin care se deplasează proteinele secretate din RE rugos spre aparatul Golgi și veziculele de secreție (fig. 19.1.), au elucidat *calea secreției celulare*, valabilă pentru toate procesele de secreție, indiferent de celulă sau substanțele secretate.

Proteinele de secreție sînt sintetizate de către ribozomii atașați RE rugos și trec imediat în cisternele RE pentru prelucrarea proteolitică și adaosul părții glucidice. Apoi proteinele sînt transferate în RE neted, care se află în relații de contiguitate cu RE rugos. Din RE neted proteinele sînt înglobate în vezicule de tranziție care trec în sacii aparatului Golgi, unde primesc grupările glucidice terminale și suferă alte procese de prelucrare. Din porțiunea distală a sacilor se desprind veziculele de secreție, care fuzionînd cu membrana celulară își varsă conținutul la exterior. Fluxul acesta este energo-dependent, deși nu este clar dacă energia este necesară numai la formarea veziculelor sau este necesară și pentru transportul acestora.

Pancreasul exocrin secretă un mare număr de enzime digestive și zimogene (enzime inactive ce sînt activate ulterior prin proteoliză): amilază, lipază, nucleaze, chimotripsinogen, tripsinogen. Veziculele ce se desprind din sacii Golgi sînt la început imature (transparente la microscopul electronic), numite și *vezicule de condensare*, deoarece conținutul acestora se concentrează prin eliminarea apei, devenind *vezicule de secreție* mature (numite și granule de zimogen), cu densitate mare. Concentrarea se produce datorită asocierii electrostatice a enzimelor, încărcate pozitiv, cu un proteoglican, încărcat negativ. Scăzînd presiunea osmotică, apa trece în citosol. În alte celule concentrarea se realizează diferit. De pildă în cazul secreției de insulină aceasta formează un complex cu metale și cristalizează, ceea ce iarăși scade activitatea osmotică. Exocitoza în celula pancreasului exocrin este indusă pe cale nervoasă (prin acetilcolină) sau printr-un hormon, colecistokinina.

Secreția insulinei în porțiunea endocrină a pancreasului a fost și ea studiată intens. Caracteristic pentru secreția insulinei este că există o *secreție bazală*, eliberîndu-se în mod constant o cantitate mică de insulină în sînge, dar la creșterea glicemiei (de ex. ingerare de glucoză) are loc o creștere marcată a cantității de insulină secretată de pancreas. În secreția insulinei s-au evidențiat rolurile microtubulilor și microfilamentelor din citoplasmă. La microscopul electronic se observă că veziculele de secreție dintre aparatul Golgi și plasmalemă sînt asociate cu microtubuli. De fapt, veziculele sînt deplasate de către microtubuli spre periferia celulei, pînă cînd ajung la rețeaua de microfilamente de la periferie, care le oprește. La stimularea celulei se modifică structura rețelei periferice de microfilamente, ceea ce permite ieșirea veziculelor secretorii din celulă. Aceasta este o primă fază, rapidă, de creștere a cantității de insulină secretate. A doua fază este constituită de mobilizarea prin microtubuli a veziculelor secretorii, aflate mai spre interiorul celulei, și vărsarea conținutului lor în sînge.

Este de remarcă faptul că *ionii de Ca^{2+}* sînt cei care produc efectele asupra microtubulilor și microfilamentelor. În mod normal există în citoplasmă o concentrație mică de Ca^{2+} rezultat al echilibrului dintre

pătrunderea Ca^{2+} în celulă și expulzarea sa printr-o pompă de calciu (Ca^{2+} -ATP-aza). Atât pătrunderea crescută a Ca^{2+} , cât și o inhibare a ieșirii sale duce la stimularea secreției de insulină. Se pare că glucoza acționează inhibând efluxul Ca^{2+} . Deci Ca^{2+} este responsabil de declanșarea secreției la fel cum intervine în cuplarea excitației cu contracția musculară. Pe lângă Ca^{2+} în secreția celulară joacă rol important *nucleotidele ciclice cAMP și cGMP*, care modulează răspunsul secretor al celulei. Ele acționează prin modificarea fosforilării și defosforilării proteinelor și prin reglarea nivelului Ca^{2+} , de pildă prin modificarea permeabilității membranelor mitocondriale pentru Ca^{2+} . În mod normal mitocondriile mențin o concentrație scăzută a Ca^{2+} în citoplasmă, Ca^{2+} fiind acumulat în mitocondrii. În cazul efectului de mai sus al cAMP și cGMP se produce creșterea concentrației citoplasmatică a ionilor de Ca^{2+} datorită creșterii efluxului Ca^{2+} din mitocondrii.

Recent au fost precizate aspecte legate de secreția de proteine a hepatocitului (Sztul, Howell și Palade, 1983). Acesta prezintă a dublă secreție: albumina și alte proteine serice în plasmă (în capilarele sinusoidale din spațiul Disse) și proteine serice, precum și alte proteine în capilarele biliare. Aceasta se realizează pe trei căi: albumina și alte proteine serice merg pe calea secretorie „clasică” (RE rugos → RE neted → aparat Golgi → vezicule de secreție → plasmalemă). Unele proteine serice sînt transportate din plasmă spre bilă prin vezicule transcelulare. Tot pe calea veziculelor transcelulare ajung în bilă proteine de membrană inițial încorporate în plasmalemă. Un caz interesant este componenta secretorie a imunoglobulinei A, care inițial se află ca proteină integrală în plasmalema sinusoidală, dar ulterior ea este adusă prin vezicule transcelulare la plasmalema biliară; în timpul acestui transport este convertită din proteină de membrană într-o proteină solubilă secretată în bilă.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Palade G. E., Intracellular Aspects of the process of protein Synthesis, Science, 189, 347—358, 1975
2. Jamieson J. D., Palade G. E., Synthesis, Intracellular Transport Discharge of Secretory Proteins in Stimulated Pancreatic Exocrine Cells, J. Cell Biol., 50, 135—158, 1971.
3. Satir B., The Final Steps in Secretion, Sci. Amer., 233, 28—37, 1975.
4. Sztul E. S., Howel K. E., Palade G. E., Intracellular and Transcellular Transport of secretory component and albumin in rat hepatocytes, J. Cell Biol., 97, 1582—1591, 1983.

20. LIZOZOMII

20.1. ULTRASTRUCTURA ȘI FUNCȚIILE LIZOZOMILOR

Lizozomii reprezintă organite celulare prezente în toate celulele și care au fost descoperite după 1950 de către *Christian De Duve*, pe baza observării la fracționarea celulei prin centrifugare diferențială a unei clase de particule ce sedimentează între mitocondrii și microzomi și care conțin enzime hidrolitice cu pH optim de acțiune acid. Fiind inițial o descoperire biochimică, abia ulterior conceptul de lizozom a căpătat suportul morfologic prin evidențierea lor la microscopul electronic, sub forma unor granule cu diametrul de 0,2—1 μm , delimitate de o membrană unică.

Lizozomii au două proprietăți esențiale: 1) conținutul enzimatic: hidrolaze cu pH optim acid; 2) latența enzimelor în celulă în condiții normale (adică inactivitatea lor). Există peste 50 enzime în lizozomi, care pot degrada practic orice componentă a celulei: acizi nucleici (prin ribonuclează acidă, dezoxiribonuclează acidă), esterii fosforici (prin fosfataza acidă, enzimă marker lizosomală), proteinele (prin collagenază, catepsină), glicogenul (prin α -glicozidază), mucopolizaharidele (prin α -manozidază, β -galactozidază, β -glucuronidază). Toate aceste enzime sînt active numai la pH acid (4—6). În mod normal enzimele nu sînt active, deoarece s-ar produce distrugerea necontrolată a conținutului celular. Latența enzimelor lizomale se datorează integrității membranei lizozomilor. Ori de cîte ori membrana este afectată, se produce pierderea latenței enzimelor lizomale, deci activarea lor. Există agenți care stabilizează membrana lizozomilor (hormonii glucocorticoizi) și alții care o labilizează (lizolecitina, lecitinazele, sărurile biliare, radiațiile ionizante, toxinele bacteriene, vitaminele A și E, înghețul alternînd cu dezghețul, șocul osmotic).

Deci lizozomii pot fi comparați cu niște saci conținînd enzime acide, care în mod normal nu-și descarcă conținutul în citoplasmă. Dacă însă membrana lor este ruptă, enzimele sînt eliberate în citoplasmă producînd liza celulei.

Membrana lizozomilor conține o proteină ce pompează H^+ în lumenul lizozomilor folosind energia rezultată din hidroliza ATP. Prin aceasta se menține pH-ul acid la interior. De asemenea și concentrația mare de proteine de la interior cu sarcini negative determină acumularea protonilor prin echilibru Donnan.

pH-ul acid determină acumularea selectivă a unor molecule mici ce străbat membrana în formă neîncărcată electric și apoi leagă un proton în interiorul lizozomului. Fiind încărcate, moleculele devin hidrofile și nu mai pot străbate membrana și prin acest mecanism se acumu-

lează în lizozomi. O astfel de substanță este clorochina, medicament anti-malaric.

Lizozomii se găsesc în toate celulele animale cu excepția eritrocitelor mature și se află și în multe celule vegetale. Se formează prin desprinderea unor vezicule din aparatul Golgi. De fapt enzimele lizozomale sînt sintetizate în ribozomii atașați reticulului endoplasmic, se acumulează în lumenul acestuia, trec apoi în aparatul Golgi, de unde se desprind îmbrăcate într-o membrană (vezi cap. 18).

Esential pentru segregarea specifică a enzimelor lizozomale în zona cis a aparatului Golgi (primele 1—2 cisterne) este prezența unui rest de manoză-6-fosfat, recunoscută de un receptor specific din membrana cisternelor Golgi. Mai mult, și în plasmalemă există receptori pentru manoză-6-P, astfel că enzimele lizozomale pot fi captate în celulă prin endocitoză mediată de receptori. Totuși în biogeneza normală a lizozomilor, enzimele lor se concentrează în primele cisterne cis ale aparatului Golgi; de aci se desprind vezicule îmbrăcate, care duc enzimele lizozomale la lizozomi și endozomi. În lizozomi se desface legătura enzimă-receptor, iar receptorii pentru manoză-6-fosfat sînt recirculați (Brown și Farquhar, 1984).

Lizozomii nou formați se numesc *lizozomi primari* și au la interior numai enzimele lizozomale latente. Lizozomii au trei funcții importante: *heterofagia* (digestia materialelor pătrunse în celulă din exterior), *autofagia* (digestia unor porțiuni din citoplasma proprie) și *crinofagia* (digestia unor materiale de secreție celulară).

În cazul *heterofagiei* lizozomii primari se unesc, fuzionează, cu veziculele endocitotice (fagozomi sau pinozomi) (fig. 20.1.). Din această unire rezultă *lizozomii secundari*, numiți în cazul fagocitozei fagolizozomi sau vacuole digestive, ce conțin la interior corpuri străine fagocitați de celulă. În lizozomii secundari are loc digestia, sub acțiunea hidrolazelor acide, a substanțelor de la interior. Produsii de digestie micromoleculari (aminoacizi, nucleotide etc.) părăsesc lizozomii trecînd în citoplasmă, unde servesc drept materie primă pentru procese biosintetice sau ca sursă de energie. Pe măsură ce produsii de digestie părăsesc lizozomul acesta își micșorează volumul, ceea ce produce invaginarea membranei lizozomale cu formarea unor vezicule (ca la pinocitoză), care apoi sînt digerate în interior. Aspectul este vizibil electro-

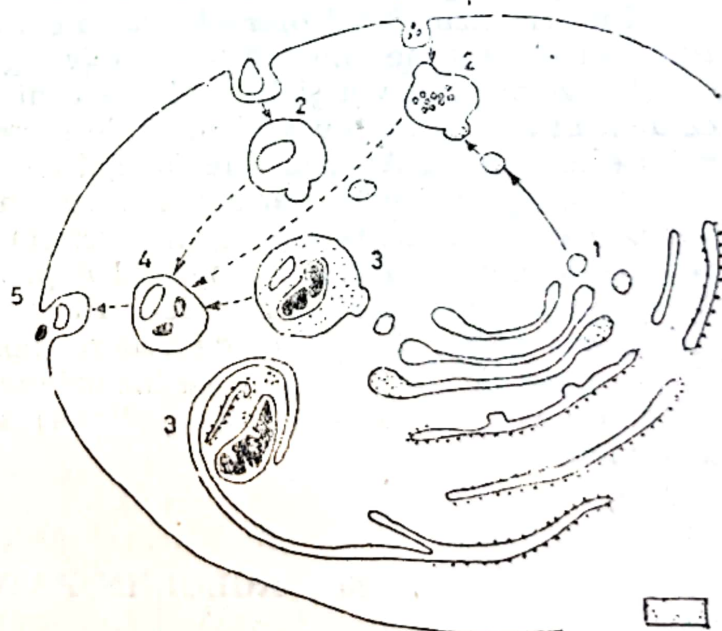


Fig. 20.1. Schema autofagiei și heterofagiei. 1. lizozomi primari; 2. lizozomi secundari (heterofagolizozomi); 3. autofagolizozomi; 4. lizozomi terțiari; 5. elemente nedigerabile eliminate la exteriorul celulei.

nomicroscopic sub forma unor vezicule mici aflate la interiorul lizozomilor secundari, denumiți *corpi multiveziculari*.

De obicei digestia corpurilor străini în lizozomi este incompletă, deoarece unele materiale nu sînt digerabile. Lizozomii care și-au terminat funcția digestivă și conțin resturi nedigerabile se numesc *lizozomi terțiari*, sau *corpi reziduali*. În unele cazuri resturile nedigerabile sînt eliminate la exteriorul celulei prin exocitoză, mai ales la protozoare (proces numit defecare celulară). La metazoare însă, resturile nedigerabile se acumulează în corpii reziduali. În cazul celulelor care nu se divid (neuroni, celule musculare), corpii reziduali se acumulează cu vîrsta formînd *granulele de lipofuscină* (incluziuni de pigmenti) după care se determină vîrsta.

Funcția de *autofagie* a lizozomilor constă în distrugerea porțiunilor uzate din citoplasmă. Astfel, mitocondriile uzate, peroxizomii, porțiunile de reticul endoplasmic uzate sînt înconjurate la început, cu o membrană numită *înveliș de izolare*, provenit din reticulul endoplasmic sau, după date recente, din aparatul Golgi. Se formează vezicule (autofagozomi) care conțin materialul intracelular ce trebuie îndepărtat (fig. 20.1.). Urmează fuziunea cu lizozomul primar formîndu-se lizozomul secundar, în care se produce digerarea materialelor incluse. Produsele de digestie sînt eliberate în citoplasmă spre a fi reutilizate, iar ceea ce rămîne formează corpii reziduali. Datorită heterofagiei lizozomii asigură reînnoirea (turnover-ul) componentelor citoplasmei: mitocondriile au viață de circa 12 zile, peroxizomii 2—3 zile, ribozomii 10 zile.

Procesele de autofagie sînt accelerate în anumite situații. De pildă, în inanție are loc înmulțirea veziculelor autofagice în ficat, la fel în mușchi în caz de inactivitate. În sfîrșit, ori de cîte ori în morfogeneză are loc involuția unor țesuturi se activează funcția de autofagie a lizozomilor (de exemplu degenerarea cozii la mormolocii de broască).

Uneori enzimele lizozomale vărsate în afara celulei produc efecte litice. Prin acest mecanism *osteoclastele* digeră țesutul osos.

Lizozomii intervin și în reglarea cantității de produși de secreție ai celulei. Ei se pot uni cu veziculele de secreție al căror conținut (zimogenele) este digerat. Aceasta este funcția de *crinofagie* a lizozomilor.

Datorită proceselor variate în care sînt implicați lizozomii și stadiilor pe care le prezintă înțelegem diversitatea de aspecte ultrastructurale pe care le pot avea (ca și stomacul depînd de „prînzul ingerat“). Dacă din punct de vedere biochimic identificarea lizozomilor este ușoară prin hidrolazele acide, din punct de vedere morfologic se ridică adesea probleme deosebite. În general orice incluziune din citoplasmă, delimitată de o membrană și avînd interiorul polimorf sau heterogen, este de natură lizozomală.

20.2. ROLUL ÎN PATOLOGIE

Lizozomii reprezintă un sistem digestiv intracelular („stomacul celulei“ după expresia lui *De Duve*), care la origine avea rol de nutriție, funcție evidentă la protozoare. Chiar și la organismele superioare sub-

stanțele micromoleculare ce rezultă din digestia intralizozomală trec în citoplasmă și sînt folosite în metabolismul celulei.

La metazoare și la om lizozomii joacă în plus un rol important în distrugerea microbilor fagocitați de către celule. Pe lângă digestia directă prin acțiunea enzimelor lizozomale, bacteriile sînt omorîte prin efecte multiple: pH-ul acid din lizozomii secundari (sub 4 în cazul neutrofililor), degradarea pereților bacterieni sub acțiunea lizozomului, producerea de O_2^- și H_2O_2 de către oxidaza din citoplasmă ce ajunge în fagolizozom (vezi cap. 6.5.5.).

Există defecte în funcția lizozomilor legate de fuziunea lizozomilor primari cu veziculele de endocitoză. Astfel, uneori fuziunea este inhibată cînd fagozomii conțin la interior bacterii vii (bacilul tuberculozei sau leprei) sau toxoplasma, un parazit protozoar. Lipsa fuziunii permite acestor microorganisme să distrugă celulele pe care le-au fagocitat și să producă boala. Alteori fuziunea lizozomilor primari cu veziculele endocitotice are loc prematur, înainte ca membrana plasmatică să fi închis complet vezicula. În acest caz conținutul lizozomilor și al granulelor specifice se poate vărsa prin vacuolă în spațiul extracelular. Procesul este numit *regurgitare* și duce la inflamație din cauza caracterului distructiv al enzimelor lizozomale. Astfel de procese apar în reumatism și în artrita gutoasă. Colchicina, o substanță foarte eficientă în tratamentul gutei, acționează inhibînd fuziunea lizozomilor cu veziculele de endocitoză și deci nu se mai produce regurgitarea. Inhibarea fuziunii produsă de colchicină se datorează acțiunii asupra microtubulilor, care intervin în deplasarea lizozomilor și în fuziune.

În *mucopolidoză II* (boală cu celule I) enzimele lizozomale nu posedă „semnalul de recunoaștere” manoză-6-P. Din acest motiv enzimele lizozomale sînt sintetizate în cantitatea normală de celule, dar sînt eliminate la exterior (de unde nu mai pot fi recaptate fiindcă și în endocitoza enzimelor lizozomale ele sînt recunoscute prin manoză-6-P).

Alte defecte în funcția lizozomilor sînt caracterizate prin lipsa unei enzime lizozomale. Acestea sînt boli genetice care se numesc *tezaurismoze lizozomale*. Lipsa unei hidrolaze produce acumularea în lizozomi a substratului enzimei respective; de exemplu se acumulează lipide sau polizaharide nedigerate, care în final umplu celula și astfel compromit funcția ei. Cele mai frecvent afectate organe sînt creierul, ficatul și splina. Acumularea produșilor de stocare este lentă, durează ani de zile, timp în care copilul pare normal și după ani de zile boala devine manifestă ducînd în final spre moarte. Exemple de boli de tezaurismare lizozomală sînt: boala Gaucher, Niemann-Pick, Tay—Sachs etc., care au fost descrise clinic înainte de a se descoperi lizozomii. Astăzi este posibil nu numai diagnosticul, dar și detectarea purtătorilor genei anormale (la ei activitatea enzimei este redusă dar nu absentă). Este posibil și diagnosticul prenatal în primele săptămîni de sarcină prin testarea activității enzimelor lizozomale în celulele cultivate din lichidul amniotic (prelevat prin puncție-amniocenteză). Dacă lipsește enzima în cauză, se întrerupe sarcina. Aceste boli nu beneficiază încă de tratament eficient. Se pun speranțe în administrarea enzimelor în cauză încorporate în lipozomi, care sînt fagocitați de către celule și apoi are loc fuziunea cu lizozomii.

Recent s-a descris corectarea unei boli lizozomale prin transplant de măduvă osoasă (Gasper și colab., 1984).

O altă formă de terapie lizozomotropică introdusă de către de Duve constă în administrarea antibioticelor antimitotice adriamicină și daunorubicină sub formă de complexe de ADN. Ajungând în lizozomi, se desface legătura dintre medicament și vehiculul transportor, iar medicamentul trece în citosol, acționând asupra celulei maligne, în timp ce transportorul este digerat în lizozomi. Sub această formă medicamentele s-au întrebuințat în tratamentul cancerelor cu diferite localizări.

În sfârșit, este de menționat că în orice necroză celulară se distrug lizozomii și prin aceasta este afectată permeabilitatea plasmalemei și trec în sânge unele enzime ce permit punerea diagnosticului în cazurile de necroză hepatică sau miocardică. Când celula moare lizozomii se distrug, are loc o autoliză postmortem, semnul cel mai precis de moarte celulară.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Aterman K., The development of the concept of lysosomes. A historical survey with particular reference to the liver, *Histochem. J.*, 11, 503—541, 1979.
2. Bainton D. F., The discovery of lysosomes, *J. Cell Biol.*, 66—76, 1981.
3. Brown W. J., Farquhar M. G., The manose-6-phosphate receptor for lysosomal enzymes is concentrated in *cis* Golgi cisternae, *Cell*, 36, 295—307, 1984.
4. De Duve C., Wattiaux R., Functions of Lysosomes, *Ann. Rev. Physiol.*, 28, 435—492, 1966.
5. Gasper P. W. și colab., Correction of feline arylsulphatase B deficiency (mucopolysaccharidosis VI) by bone marrow transplantation, *Nature*, 312, 467—469, 1984.
6. Hers H. G., Van Hoof F., *Lysosomes and Storage Diseases*, Academic Press, London, 1973.
7. Hollemans M., Donker-Koopman W., Tager J., A critical examination of the evidence for an MgATP-dependent proton pump in rat liver lysosomes, *Biochim. Biophys. Acta*, 603, 171—177, 1980.
8. Mortimer G. E., Pösö A. R., Lysosomal pathways in hepatic protein degradation: regulatory role of amino acids, *Fed. Proc.*, 43, 1289—1294, 1984.
9. Rejngoud D. J., Tager J. M., The permeability properties of the lysosomal membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, 472, 419—449, 1977.
10. Sahagian G. G., The manose-6-phosphate receptor: function, biosynthesis and translocation, *Biol. Cell*, 51, 207—214, 1984.
11. Tager J. M. și colab., The role of lysosomes in intracellular digestion: synthesis of acid hydrolases and primary packaging in primary lysosomes, In: *Cell Biological Aspects of Disease* (W. Th. Daems et. al. Eds.), Martinus Nyhoff Publishers bv, The Hague, 1981, pp. 235—250.
12. Van Hoof F., *Les Mucopolysaccharidoses en Tant Que Thesaurismoses Lysosomiales*, Vander Louvain, 1972.

21. PEROXIZOMII: ULTRASTRUCTURĂ, FUNCȚII, IMPLICAȚII BIOMEDICALE

Peroxizomii sînt organite celulare caracterizate prin capacitatea lor de a produce și descompune apa oxigenată. Au fost observați la microscopul electronic în 1954 de către *Rhodin* în rinichi (denumiți „microbodies“). Ulterior conceptul de peroxizomi, ca organite distincte, a fost dezvoltat de către *De Duve* și colab. din studii de fracționare a celulei hepatice, prin care s-a evidențiat o fracțiune subcelulară avînd ca enzime marker uratoxidaza, catalaza și D-aminoacidoxidaza. Apoi aceste organite au fost caracterizate și morfologic și s-a observat că apar la foarte multe specii de plante și animale, iar la om în multe țesuturi. Precizarea recentă a unor funcții precise ale peroxizomilor, ca și implicarea lor într-o serie de boli, face studiul peroxizomilor o problemă foarte actuală.

Ultrastructură. Peroxizomii au formă sferică sau ovală, cu dimensiuni de 0,5—1 μm , variabile de la o celulă la alta. Sînt înconjurați de o singură membrană de circa 6 nm grosime, iar la interior au o matrice densă, cu aspect granular. În unele celule în matrice se observă o zonă centrală densă, numită *miez* sau *cristaloid*, care la mărire puternică la microscopul electronic prezintă o structură ordonată cvasicristalină, de fapt politubulară. Cristaloidul este alcătuit în general din enzima uratoxidază și nu apare decît la unele specii (la om numai în condiții patologice).

Se consideră că proteinele integrale din membrana peroxizomilor sînt produse în RE și se aglomerează în membrana RE formînd un pre-organit; apoi acesta generează peroxizomul prin înmugurire și fisiune din RE neted. Unele enzime majore peroxizomale (inclusiv catalaza și uratoxidaza) sînt sintetizate în citosol și sînt transportate în peroxizomi în momentul formării acestora. Deoarece peroxizomii maturi sînt văzuți de multe ori la microscopul electronic legați printr-o prelungire ca un deget de mînușă de RE neted, s-a sugerat că mulți peroxizomi rămîn atașați în loc să devină organite independente.

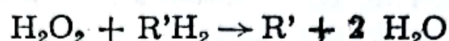
După introducerea unei colorații histochimice pentru catalază, s-a descris o variantă a peroxizomilor, așa-numiții *microperoxizomi*, de circa 0,2 μm , la care lipsește miezul central. Conțin aceleași enzime ca și peroxizomii și sînt prezenți în toate celulele mamiferelor, pe cînd peroxizomii mai mari se află numai în unele celule.

Conținutul enzimatic al peroxizomilor este caracteristic. Ei conțin enzime ce produc sau descompun H_2O_2 (peroxidul de hidrogen, de aci și numele de peroxizomi). Enzime ce catalizează reacții prin care se produce

apa oxigenată sînt: *D-aminoacidoxidazele* și *L-alfa-hidroxiacidoxidazele*. D-aminoacidoxidazele constituie mecanismul primar de utilizare a D-aminoacizilor, obținuți mai ales din bacteriile intestinale. Un exemplu este dezaminarea alaninei cu formarea piruvatului. Alfa-hidroxiacidoxidazele convertesc alfa-hidroxiacizii la alfa-cetoacizi, de exemplu lactatul este oxidat la piruvat. În general, reacția catalizată de aceste enzime ce folosesc oxigen molecular pentru a îndepărta atomii de hidrogen din substrat, se poate scrie:



Apa oxigenată generată prin asemenea reacții este folosită de *catalază*, principala enzimă din peroxizomi, care poate oxida alcooli, fenoli, acid formic, formaldehidă, după reacția:



Prin aceasta peroxizomii joacă rol în detoxificarea diferitelor molecule. De pildă, aproape jumătate din etanolul băut este oxidat astfel în acetaldehidă. Peroxizomii consumă circa 10% din oxigenul folosit de ficat. Pentru funcția de detoxificare este important că membrana peroxizomilor este neobișnuit de permeabilă pentru ioni și molecule cu greutate moleculară mică.

La concentrație mică a substanțelor $R'H_2$ catalaza va oxida apa oxigenată: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$. Această reacție se consideră ca o „supapă de siguranță” pentru îndepărtarea agentului oxidant H_2O_2 în absența unui aport suficient de donori de hidrogen $R'H_2$. Apa oxigenată este toxică pentru celulă, formînd radicali liberi foarte reactivi, ce atacă proteinele și acizii nucleici.

Pe lîngă reacțiile de detoxificare peroxizomii mai catalizează oxidarea acizilor grași în acetil CoA folosind o enzimă specială ce produce H_2O_2 . Acetil-CoA este transportat la mitocondrii pentru a intra în ciclul Krebs, sau este folosit pentru reacții biosintetice. Se apreciază că 1/4—1/5 din totalul oxidării acizilor grași are loc în peroxizomi, restul avînd loc în mitocondrii. Caracteristic peroxizomilor este faptul că oxidează acizii grași cu lanț lung de atomi de C, iar cînd lanțul s-a scurtat la 6 atomi de C, urmează oxidarea în mitocondrii, deci peroxizomii colaborează cu mitocondriile în oxidarea acizilor grași.

Date recente arată că peroxizomii au o funcție specifică în celulele animale și anume de a sintetiza *plasmalogenii* (care seamănă cu fosfolipidele, dar lanțurile acizilor grași sînt legate de glicerol prin legături eterice, nu esterice). Plasmalogenii intră în proporție de circa 10% în unele membrane și importanța lor rezultă din gravele perturbări cerebrale, hepatice și renale din *sîndromul Zellweger* în care lipsesc complet peroxizomii.

La plante există două tipuri de peroxizomi cu roluri bine precizate. Un tip se află în *semințe*, unde convertesc grăsimile în glucide, proces ce intervine în dezvoltarea plantei din semințe.

Procesul are la bază ciclul glioxilatului în care se folosesc două molecule de acetil CoA (provenit din oxidarea acizilor grași) pentru a

produce acid succinic; acesta părăsește peroxizomul fiind convertit în glucoză. Acești peroxizomi se mai numesc *glioxizomi*. Tot la plante, peroxizomii din frunze realizează *fotorespirația*, proces prin care plantele captează O_2 și elimină CO_2 .

Implicații medicale. Peroxizomii lipsesc în *sindromul cerebrohepato-renal*. Zellweger observat la noii născuți (hipotonie severă, acumulări de lipide în creier, hepatomegalie cu ciroză, chiste renale, anomalii scheletice) care duce la moarte înaintea vârstei de un an.

Recent s-a descris o diminuare a funcției peroxizomilor de oxidare a acizilor grași cu lanț lung de atomi de C în *adrenoleucodistrofii*, boli genetice letale caracterizate prin distrugerea progresivă a substanței albe din creier și a corticosuprarenalei. Pe lângă faptul că *acatalazemia* (lipsa catalazei) este o boală genetică, există alte motive de interes pentru studiul peroxizomilor în medicină. De Duve atrage atenția asupra relației peroxizomi-cancer. Astfel, una dintre cele mai constante trăsături biochimice ale cancerelor este activitatea catalazică scăzută în ficat la animalele cu tumori. Mai mult, peroxizomii pot fi încă identificați în tumorile cu creștere lentă, dar lipsesc total în cele cu creștere rapidă.

Peroxizomii apar în mare număr și cu dimensiuni mărite în condiții patologice cum sînt hepatita virală sau după administrarea îndelungată de medicamente ce scad lipemia.

În concluzie peroxizomii, ca cele mai recent descoperite organite celulare, încep abia acum să-și dezvăluie secretele și odată cu aceasta apare importanța lor în patologie.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. De Duve C., Baudhuin P., Peroxisomes (microbodies and related particles), *Physiol. Rev.*, 46, 323—357, 1966.
2. Frederick J. F., *Origins and Evolution of Eukaryotic Intracellular Organelles*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 361, 1981.
3. Goldfisher S., Peroxisomes in disease, *J. Histochem. Cytochem.*, 27, 1371—1373, 1979.
4. Goldfisher S., și colab., Peroxisomal defects in neonatalonset and X-linked adrenoleukodistrophies, *Science*, 227, 67—69, 1985.
5. Kindl H., Lazarow P. B., *Peroxisomes and Glyoxysomes*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 386, 1982.
6. Masters C., Holmes R., Peroxisomes: new aspects of cell physiology and biochemistry, *Physiol. Rev.*, 57, 816—882, 1977.
7. Borst P., Animal peroxisomes (microbodies), lipid biosynthesis and the Zellweger syndrome, *Trends Biochem. Sci.*, 8, 269—272, 1983.
8. Tager J. M. și colab., Peroxisomal β -oxidation enzyme proteins in the Zellweger syndrome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126, 1269—1275, 1985.

22. MITOCONDRILLE

22.1. MORFOLOGIE ȘI ULTRASTRUCTURA

Mitocondriile sînt organitele specializate în producerea energiei necesară activităților celulei eucariote, fiind adevărate „centrale energetice”, în care energia eliberată prin oxidarea unor substraturi este convertită în energie chimică (ATP) prin procesul de fosforilare oxidativă (sînt „fabricile de ATP ale celulei”). Mitocondriile se găsesc în aproape toate celulele eucariote (excepție fac eritrocitele adulte), atât la plante cît și la animale. Plantele mai au și alte organite, *cloroplastele*, care captează energia luminii și o transformă în energie chimică (ATP), prin procesul de fotosinteză. La procariote reacții anologice celor din mitocondrii și cloroplaste sînt catalizate de sisteme enzimatice localizate în membrana plasmatică.

Mitocondriile au fost observate la microscopul optic de către diferiți citologi în a doua jumătate a secolului XIX (Kölliker, Altman, Benda) sub formă de granule și filamente cărora li s-au dat diferite denumiri, dintre care în final s-a impus cea de mitocondrie. Ulterior s-a sugerat că

mitocondriile sînt sediul respirației celulare, adică sediul utilizării oxigenului în celulă, dar abia după 1950 s-a precizat ultrastructura mitocondriilor prin microscopie electronică. Compoziția chimică, organizarea moleculară și funcțiile mitocondriilor au putut fi studiate numai după izolarea lor prin centrifugare diferențială, realizată de *Hogboom*, *Schneider* și *Palade* în 1948. În 1952 *Palade* și *Sjöstrand* (independent) au elucidat ultrastructura mitocondrii pe secțiuni de ficat (fig. 22.1.).

Mitocondria posedă două membrane care delimitează două compartimente. *Membrana externă* este netedă, pe cînd *membrana internă*, ce urmărește în general conturul membranei externe, prezintă din loc în loc pliuri sau invaginări numite *cresie mitocondriale*, de forme variate. Fiecare din cele două membrane are o grosime de circa

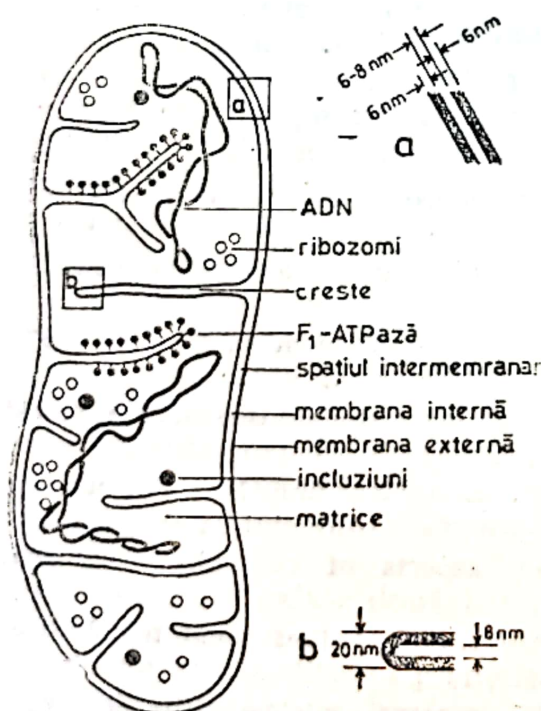


Fig. 22.1. Diagrama ultrastructurii mitocondrii.

6 nm, delimitând între ele un spațiu intermembranar de circa 6—8 nm, electron transparent, care se prelungește și în crestele mitocondriale. Compartimentul central înconjurat de membrana internă este numit *matrice mitocondrială*. În aceasta se pot distinge la microscopul electronic granulații fine, iar uneori și granule cu densitate electronică mare, probabil depozite de calciu. În matrice se află și ribozomi, precum și ADN atașat de obicei de membrana internă în câteva puncte. Prin colorație negativă se pot distinge la microscopul electronic proeminențe sferice pe membrana internă, cu dimensiunea de circa 8 nm, legate de membrană printr-un pedicul. În aceste proeminențe se află localizată F_1 -ATPaza, o parte din complexul ce sintetizează ATP-ul.

În diferite celule mitocondriile prezintă particularități legate de adaptarea la funcțiile celulei.

Numărul mitocondriilor într-o celulă este variabil: în hepatocite în jur de 1000, în celulele renale 300, în spermatozoizi 20—24, pe când în hematii lipsesc; (în regnul animal există alge unicelulare cu o singură mitocondrie sau amebe cu 500.000 mitocondrii).

Mitocondriile sînt localizate în celulă acolo unde este necesar ATP în cantitate mare. Astfel, în mușchiul scheletic mitocondriile se află aranjate regulat între miofibrile, în spermatozoid sînt dispuse elicoidal în jurul axonemei flagelului, în neuroni în regiunea sinaptică, în pancreasul exocrin asociate cu RE rugos, generînd ATP necesar biosintezei proteinelor. În pancreas și în miocard se pot observa mitocondrii și în apropierea sursei de substrat, de pildă în jurul unei picături de grăsime.

Forma și dimensiunile mitocondriilor sînt variabile. În general au formă alungită cu lungimea de circa 3 μm și diametrul de 0,5—1 μm . În pancreas pot avea formă de filamente cu lungimea de 10 μm . Crestele mitocondriale pot avea și ele forme și dispoziții variate. În general crestele sînt perpendiculare pe axa lungă a mitocondriei, numărul și suprafața lor fiind cu atît mai mari cu cît metabolismul celulei este mai activ. De exemplu, crestele sînt mult mai dezvoltate în mitocondriile din miocard față de mitocondriile hepatice. În neuronii din SNC crestele sînt paralele cu axa lungă a mitocondriei, pe cînd în celulele corticosuprarenale au formă de tuburi.

Trebuie subliniat că mitocondriile nu trebuie imaginate ca obiecte statice; dimpotrivă, în celulele vii observate la microscop în contrast de fază sau filmate, mitocondriile prezintă modificări continue ale formei, precum și mișcări, fiind antrenate în curenții citoplasmatici, după cum suferă și fragmentări sau fuziuni. Adesea sînt aliniate pe microtubuli. Forma este dependentă de respirație și fosforilare, observîndu-se modificări în anaerobioză sau după administrarea de ATP ori decuplanți ai fosforilării oxidative. De asemenea și aspectul mitocondriilor pe secțiuni variază cu diferențierea celulei, nutriția, deshidratarea, administrarea unor hormoni sau medicamente sau în condiții patologice.

Mitocondriile izolate din omogenate au de obicei o formă sferică. Se descriu două stări conformaționale ale mitocondriilor izolate. Starea „ortodoxă” corespunde în general structurii din țesut, doar forma este sferică. Starea „condensată” are aspect foarte diferit: nu se mai disting crestele, matricea este foarte opacă, astfel încît practic membrana internă

împreună cu matricea se condensează și reprezintă numai 50% din volumul mitocondriei. Cele două conformații sînt dependente de starea metabolică a mitocondriei și de transportul ionilor și al apei.

22.2. COMPOZIȚIE CHIMICĂ, PROCESE METABOLICE ȘI ENZIME LOCALIZATE ÎN MITOCONDRII

S-au elaborat diferite procedee de fracționare a mitocondriilor, prin care s-au purificat membranele interne, externe, matricea și fracțiunea corespunzătoare spațiului intermembranar. În acest mod s-a stabilit compoziția chimică a celor două membrane mitocondriale și localizarea enzimelor mitocondriale.

Mitocondriile conțin 60—70% proteine și 25—30% lipide (dintre lipide 95% sînt fosfolipide, restul fiind colesterol și alte lipide). Compoziția celor două membrane mitocondriale diferă mult, atît în ceea ce privește lipidele, cît și în privința compoziției proteice. Astfel, membrana externă conține 50% proteine și are o compoziție asemănătoare membranelor reticulului endoplasmic; ea conține tot colesterolul mitocondriei, iar dintre fosfolipide este mai bogată în fosfatidilinozitol și fosfatidilserină. Membrana internă conține 80% proteine și are un conținut de 10% cardiolipină. Fosfatidilcolina și fosfatidiletanolamina se află în cantități egale în cele două membrane.

Există diferențe în compoziția în acizi grași, a fosfolipidelor din membranele mitocondriale la diferite specii, ceea ce are consecințe asupra fluidității membranei și asupra activității enzimelor de membrană. Mitocondriile din ficatul uman au fost caracterizate în premieră de către grupul nostru de cercetători (vezi ref. Benga și colab.).

Procesele metabolice localizate în mitocondrii pot fi încadrate în două mari clase: cele aparținînd metabolismului energetic și cele biosintetice.

1) Procese ale metabolismului energetic (fig. 22.2.):

a. Acizii grași trec din citosol în matrice unde intră în ciclul β -oxidării, la fiecare tură îndepărtîndu-se doi atomi de carbon de la capătul carboxil și rezultă o moleculă de acetyl CoA.

b. Glucoza este supusă glicolizei în citosol, rezultînd două molecule de piruvat, care în matrice este convertit de către complexul piruvat-dehidrogenazei în acetyl CoA.

c. Acetyl-CoA rezultat din acizii grași sau din glucoză intră în ciclul citric (tot în matrice), prin care la fiecare tură se produc 2CO_2 , 3NADH și 1FADH_2 .

d. NADH -ul și FADH_2 -ul sînt apoi oxidați în membrana internă de către lanțul respirator, folosindu-se oxigen molecular (respirația celulară).

e. Energia eliberată prin oxidări este folosită pentru sinteza de ATP de către complexul ATP sintetazei din membrana internă.

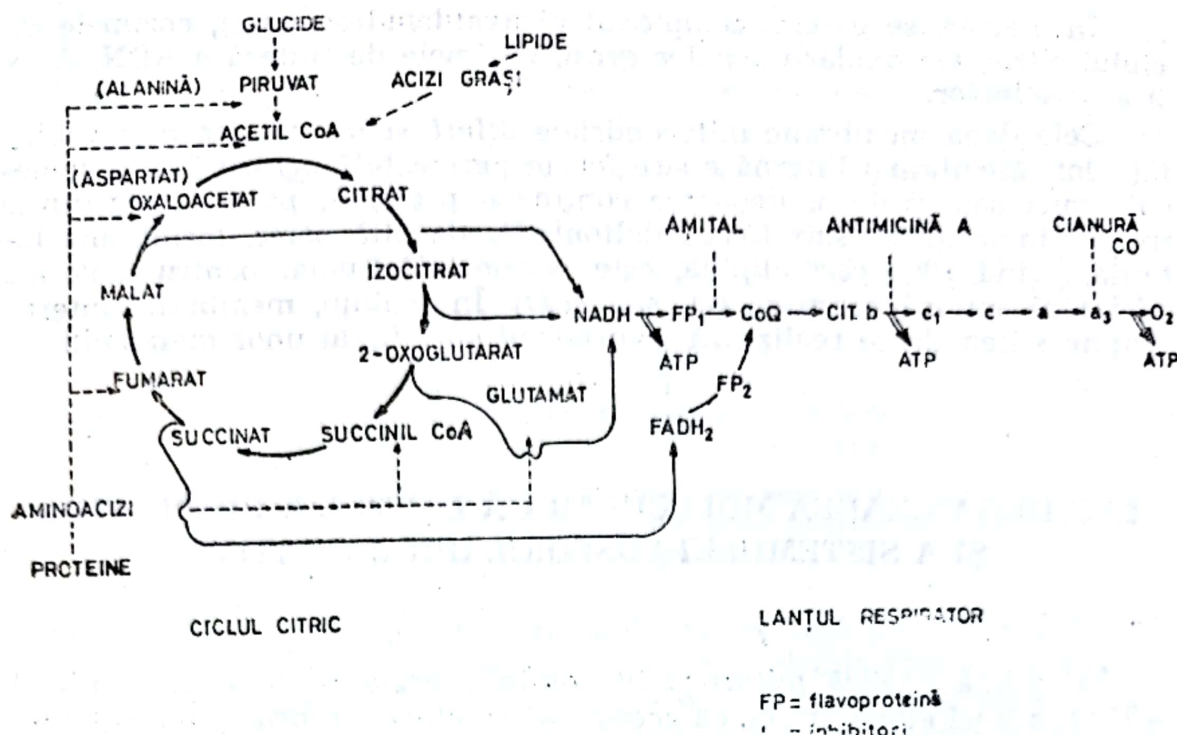


Fig. 22.2. Schema metabolismului energetic celular.

Fără mitocondrii celulele animale ar depinde de glicoliza anaerobă, prin care fiecare moleculă de glucoză generează 2 molecule de ATP. În schimb, dacă metabolismul glucozei este completat în mitocondrii până la oxidarea completă la CO_2 și H_2O , fiecare moleculă de glucoză produce 36 molecule de ATP. Spre a se asigura un aport continuu de acizi grași, respectiv de piruvat, celulele dispun de depozite de grăsimi (trigliceride) și glucide (glicogen), mai ales în țesutul adipos și, respectiv, ficat și mușchi. Grăsimile generează de 6 ori mai multă energie decât o masă egală de glicogen hidratat. În medie corpul uman are o rezervă de glicogen suficientă pentru o zi de activitate normală și grăsimi pentru o lună.

Procese biosintetice: mitocondriile conțin ADN, ARN, ribozomi și toate enzimele necesare exprimării genelor mitocondriale. În mitocondrii se desfășoară unele etape din sinteza hemului și a hormonilor steroizi (în suprarenală).

Localizarea enzimelor mitocondriale se prezintă astfel. În membrana externă este localizat un grup heterogen de enzime: monoaminoxidaza (implicată în oxidarea adrenalinei, serotoninei și triptaminei), enzime ce produc elongarea acizilor grași C_{14} și C_{16} și altele.

În membrana internă sînt localizate componentele lanțului respirator, ale complexului sintezei ATP, sistemele de transport ale ionilor și unele enzime din sistemul elongării acizilor grași C_{10} .

În spațiul intermembranar se află adenilat kinaza, ce catalizează reacția: $\text{ATP} + \text{AMP} \rightleftharpoons 2 \text{ADP}$. Prin aceasta se reutilizează AMP-ul, fiindcă ADP-ul va fi fosforilat la ATP.

În matrice se găsesc: complexul piruvatdehidrogenazei, enzimele ciclului citric, ale oxidării acizilor grași, enzimele de sinteză a ADN, ARN și a proteinelor.

Cele două membrane mitocondriale diferă și în privința permeabilității lor. Membrana internă apare foarte permeabilă pentru ioni și molecule mici sau mijlocii, deoarece conține o proteină, *porina*, ce permite trecerea moleculelor sub 10.000 daltoni. Pe de altă parte, membrana internă, avînd 10% cardiolipină, este permeabilă numai pentru molecule mici fără sarcină electrică (O_2 sau H_2O). În schimb, membrana internă conține sistemele ce realizează transportul specific al unor metaboliți.

22.3. ORGANIZAREA MOLECULARĂ A LANȚULUI RESPIRATOR ȘI A SISTEMULUI FOSFORILĂRII OXIDATIVE

În ultimă analiză mitocondriile obțin energia reacției: $H_2 + 1/2 O_2 \rightarrow H_2O$ în mici etape, în loc ca aceasta să se elibereze brusc sub formă de căldură, ca în cazul arderii H_2 în O_2 . Pentru aceasta folosesc o cale indirectă a reacției, în care primul pas este separarea electronilor de protoni. Electronii sînt trecuți prin *lanțul respirator* aflat în membrana internă, pe cînd protonii scapă în mediul apos înconjurător și se reîntorc abia în finalul lanțului respirator, cînd neutralizează sarcinile negative create de electroni pe molecula de oxigen. Inițial electronii au o energie foarte mare; pe măsură ce se scurg în lanțul respirator energia lor scade, dar ea este folosită pentru pomparea protonilor din matrice în spațiul intermembranar (în afara mitocondriei) de către componentele lanțului respirator. Apoi electronii se scurg înapoi în matrice prin *complexul ATPsintetazei* care produce ATP din ADP și fosfat anorganic (o moleculă de ATP pentru 3 H^+). Această sinteză de ATP (fosforilarea ADP-ului) ce acompaniază oxidarea metaboliților prin lanțul respirator este numită *fosforilare oxidativă*.

Lanțul respirator este un complex de componente (majoritatea proteine) care oxidează NADH și $FADH_2$ proveniți din ciclul citric și din oxidarea acizilor grași. Componentele lanțului respirator suferă oxidare sau reducere prin adaosul ori îndepărtarea electronilor. Organizarea funcțională a lanțului respirator mitocondrial trebuie privită sub două aspecte, cel al secvenței componentelor din lanțul respirator și cel al topografiei, adică al aranjării lor spațiale în membrana internă mitocondrială.

Transferul electronilor de pe substrat pe oxigenul molecular se produce într-o secvență determinată de valoarea *potențialului redox* al componentelor lanțului respirator. (Se știe că un cuplu redox este format din două forme, una oxidată și alta redusă al unui anumit compus. Capacitatea unui cuplu redox de a ceda sau accepta electroni este exprimată prin potențialul de electrod, adică potențialul unui electrod de platină cufundat într-o soluție ce conține componentele cuplului redox.

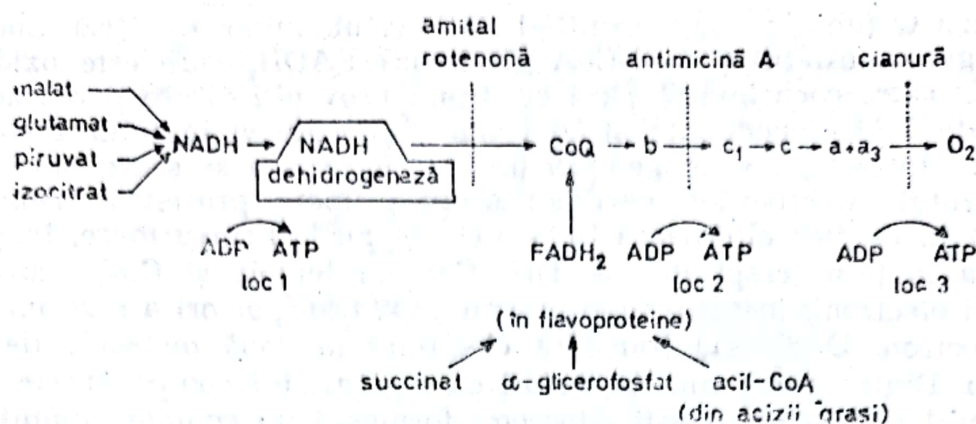


Fig. 22.3. Schema lanțului transportor de electroni mitocondrial cu indicarea celor trei locuri de fosforilare și a sediului acțiunii inhibitorilor transferului electronilor (cu linii punctate).

Dacă se măsoară potențialul unui cuplu redox față de electrodul standard de hidrogen la 25°C, pH = 7 și când concentrația formei reduse este egală cu concentrația formei oxidate, se obține potențialul standard redox. Potențialul redox al unui cuplu este o măsură a puterii oxidante ori reducătoare a aceluia cuplu redox. Un cuplu redox are tendința să oxideze, adică să accepte electroni de la un cuplu cu potențial mai negativ și să reducă, adică să doneze electroni altor cupluri redox cu potențial mai pozitiv.

În lanțul respirator mitocondrial electronii se scurg ca într-un șir de cascade de la o componentă la alta în ordinea creșterii potențialului redox. Ordinea principalelor componente ale lanțului respirator este redată în fig. 22.3., iar în tabelul 22.1. sînt redată potențialele redox standard (E'_0) ale acestora. Diferența de potențial (E_0) în lungul lanțului respirator este: $(+0,82) - (-0,32) = 1,14$ V.

Din fig. 22.3. se observă că unele substraturi din ciclul citric generează NADH (așa-numitele substraturi NAD-dependente). În prima reacție din lanțul respirator, catalizată de NADH dehidrogenază, NADH (+H⁺) este oxidat la NAD⁺, iar cei doi protoni și doi electroni sînt preluați de gruparea prostetică a NADH dehidrogenazei, FMN, care se reduce la FMNH₂. Electronii și protonii sînt apoi transferați de pe FMNH₂ la

Tabelul nr. 22.1. Potențialele redox standard (E'_0) ale unor componente ale lanțului respirator

Forma redusă	Forma oxidată	E'_0 (V)
NADH + H ⁺	NAD ⁺ (+2e ⁻)	-0,32
FADH ₂ - proteină	FAD - proteină	
Ubiquinona (UQH ₂)	Ubiquinona oxidată	+0,10
Citocrom b (Fe ²⁺)	Citocrom b (Fe ³⁺)	+0,12
Citocrom c ₁ (Fe ²⁺)	Citocrom c ₁ (Fe ³⁺)	+0,21
Citocrom a (Fe ²⁺)	Citocrom a (Fe ³⁺)	+0,29
H ₂ O	1/2O ₂ + (2H ⁺ + 2e ⁻)	+0,82

coenzima Q (ubiquinona), rezultând FMN și ubiquinona redusă. Succinatul, α -glicerofosfatul și acil-CoA generează FADH_2 , care este oxidat la FAD de către coenzima Q. Deci electronii proveniți din oxidarea acestor substraturi FAD-dependente străbat numai porțiunea lanțului respirator cuprinsă între CoQ și oxigen. De la CoQ electronii se scurg pînă la O_2 prin lanțul citocromilor, care au drept grupare prostetică hemul, în care ionul de fier alternează între Fe^{2+} și Fe^{3+} . Prin urmare, în prima parte a lanțului respirator NADH, flavinproteinele și CoQ transportă cîte doi electroni, în timp ce citocromii sînt transportori a cîte unui singur electron. Deci CoQ transferă electronii la două molecule de citocrom b. Dintre citocromi, cei notați cu a și a_3 sînt componentele finale din lanțul respirator. Acești citocromi formează un complex numit *citocromoxidază*. Electronii sînt transferați la început pe citocromul a și apoi pe citocromul a_3 , iar de aci pe oxigenul molecular. Citocromul a_3 conține Cu care poate alterna între forma Cu^{2+} și Cu^{1+} .

Lanțul respirator cuprinde circa 15 molecule diferite transportoare de electroni. Cu excepția ubiquinonei (coenzima Q), electronii trec în componentele lanțului respirator de la un atom de metal la altul. Componentele vecine sînt grupate împreună în *complexe enzimatice respiratorii* care au putut fi purificate din membrana internă. (fig. 22.4.). În cazul oxidării NADH-ului există trei complexe:

a) complexul NADH dehidrogenazei (12 lanțuri polipeptidice) acceptă electroni de la NADH și îi transferă ubiquinonei, o moleculă mică liposolubilă;

b) complexul b- c_1 (8 lanțuri polipeptidice) există ca dimer, acceptă electronii de la ubiquinonă și îi pasează citocromului c, o proteină mică, periferică, ce duce electronii la:

c) complexul citocromoxidazei (citocromii a și a_3), cu 7 lanțuri polipeptidice (există ca dimer). Acceptă 4 electroni de la molecule de cit. c și îi predă O_2 , după reacția:

$\text{O}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$. Nu se știe precis cum reacționează o moleculă de oxigen cu 4 electroni și 4 protoni. Citocromoxidazei îi revine 90% din consumul de oxigen al celulei.

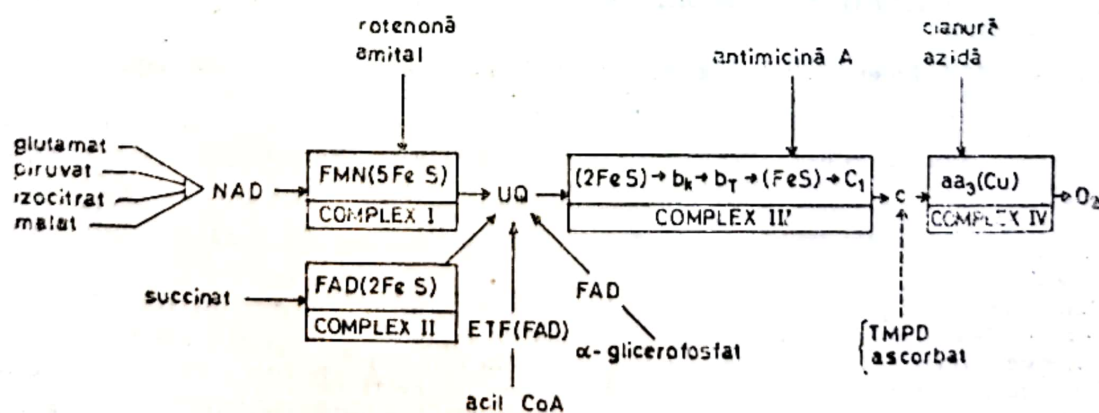


Fig. 22.4. Schema complexelor lanțului respirator.

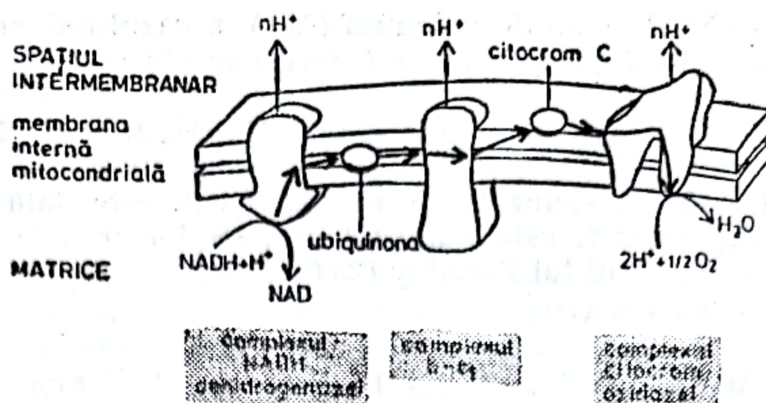


Fig. 22.5. Diagrama scurgerii electronilor prin componentele lanțului respirator în membrana internă mitocondrială.

Cele 3 complexe majore difuzează ca entități independente în planul membranei: într-o secundă parcurg o distanță echivalentă cu de $1000 \times$ diametrul lor. Moleculele ubiquinonă și cit. c se mișcă de 10 ori mai rapid, transportând electronii între complexe, ele au coeficienți de difuziune similari cu ai fosfolipidelor. Deci transportul electronilor se face prin ciocnirea la întâmplare a componentelor lanțului respirator, nu există o aranjare ordonată a lor în membrană (fig. 22.5.). De altfel și raportul între componente diferă: la 1 complex NADH dehidrogenazei corespund: 3 complexe b-c₁, 7 complexe citocromoxidază, 9 molecule de cit. c. și 50 molecule de ubiquinonă.

Sistemul enzimatic de sinteză a ATP-ului este reprezentat de complexul ATPsintetazei sau ATPazei. Acesta se compune din trei părți: proeminența sferică vizibilă la microscopul electronic prin colorație negativă (numită F₁-ATPaza), un pedicul de legătură cu membrana numit OSCP („Oligomycin Sensitivity Conferring Protein“) și sectorul membranal al ATPazei.

În prezent se știe că există o complexitate structurală considerabilă a complexului ATPazei. Astfel, în sectorul membranal se află 4 polipeptide, iar în F₁-ATPază 6 specii de polipeptide, dintre care două apar în 3 exemplare. În total complexul ATPazei este format din 15 polipeptide însumând o greutate moleculară de 464.300 (fig. 22.6.).

22.4. FOSFORILAREA OXIDATIVĂ

Funcția esențială a mitocondriei constă în sinteza ATP folosind energia rezultată din oxidarea NADH și FADH₂ proveniți din ciclul citric și din oxidarea acizilor grași.

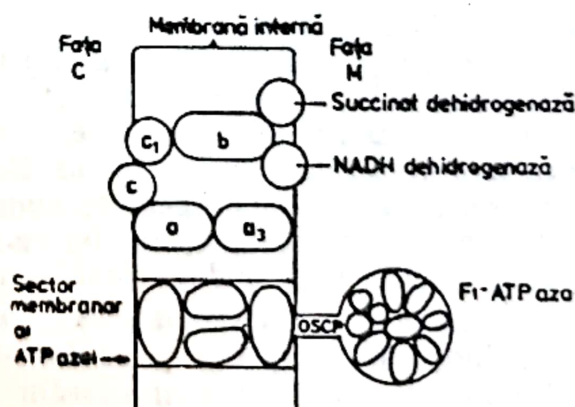
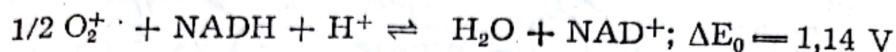


Fig. 22.6. Topografia componentelor lanțului respirator și ale complexului ATPazei în membrana internă mitocondrială.

Am văzut că diferența de potențial (ΔE_0) în cazul oxidării NADH de către O_2 este de 1,14 V. Reacția poate fi scrisă sub forma:



Energia liberă corespunzătoare acestei reacții este dată de formula: $\Delta G^0 = -n.F.\Delta E_0$, unde n este numărul electronilor transferați (în cazul acesta 2), F este numărul lui Faraday (23.062 cal).

În cazul oxidării NADH energia liberă este:

$$\Delta G^0 = -2 \times 23.062 \times 1,14 = -52,6 \text{ kcal/mol}$$

Deci reacția este o reacție exergonică, energia degajată avînd valoarea de circa 53 kcal/mol NADH oxidat. În cazul oxidării $FADH_2$ calcule analoage dau valoarea de circa 37 kcal/mol.

Energia rezultată prin oxidările NADH și $FADH_2$ este în proporție de circa 50% folosită pentru sinteza de ATP, care se produce simultan cu scurgerea electronilor prin lanțul respirator. Restul energiei provenite din oxidări, neînmagazinată în ATP, este disipată sub formă de căldură. Acest proces joacă un rol esențial în menținerea temperaturii corpului la animalele cu sînge cald.

Energia necesară pentru sinteza unei molecule de ATP este în condiții standard (concentrații ale reactanților de 1M) de circa 7 kcal/mol, dar în condițiile din celulă (pH=7,0, concentrațiile de ATP, ADP, fosfat anorganic și magneziu existente în celulă) de circa 9 kcal/mol. Deci numai reacțiile din lanțul respirator, care eliberează o cantitate mai mare de energie decît 9 kcal/mol, pot genera ATP. Astfel de reacții sînt cele notate în fig. 22.3: oxidarea NADH de către NADH dehidrogenază, a citocromului b de către citocromul c_1 și a citocromilor aa_3 de către oxigen. Deci în cazul oxidării NADH de către lanțul respirator există trei locuri de fosforilare, fiind generate trei molecule de ATP pentru o moleculă de NADH. Cum oxidarea $FADH_2$ începe de la nivelul CoQ, pentru fiecare moleculă de $FADH_2$ oxidată se sintetizează două molecule de ATP. Pe lîngă argumentele termodinamice randamentul fosforilării oxidative de mai sus este astăzi dovedit și experimental.

Dacă se măsoară cantitatea de fosfat anorganic folosită pentru sinteza ATP în timpul oxidării unor substraturi se constată că în cazul substraturilor NAD-dependente (glutamat, piruvat etc.) se consumă trei moli de fosfat pentru un mol de oxigen. În schimb, la oxidarea succinatului se consumă numai 2 moli de fosfat. Raportul dintre fosfatul consumat (prin sinteza de ATP) și oxigen se numește raportul P:O. El măsoară deci randamentul fosforilării oxidative. Un echivalent al acestuia este raportul ADP:O, ce se determină polarografic (fig. 22.7.).

Studiul fosforilării oxidative a beneficiat și de utilizarea inhibitorilor lanțului respirator și ai fosforilării oxidative. Aceștia sînt de trei feluri:

a) inhibitorii transferului electronilor: blochează trecerea electronilor într-o anumită etapă a lanțului respirator; de exemplu (fig. 22.3.) amitalul și rotenona acționează între NAD și CoQ, antimicina A între

cit. b și c, iar cianura și CO la nivelul citocromoxidazei; blocarea transferului electronilor explică mecanismul toxicității acestor substanțe;

b) decuplării fosforilării oxidative împiedică sinteza ATP fără a influența transferul electronilor prin lanțul respirator. Exemplul clasic este 2,4-dinitrofenolul, care scade pînă la 0 cîtul P : O;

c) inhibitorii transferului de energie (inhibitorii fosforilării oxidative): blochează transferul energiei de la lanțul respirator spre ATP, de exemplu oligomicina. Ea acționează numai asupra F_1 -ATPazei legată de membrană, nu și asupra F_1 -ATPazei detașate. De aci și denumirea de OSCP (factor de conferire a sensibilității la oligomicină) dată tulpinii ATPazei. Oligomicina inhibă respirația cuplată cu fosforilarea, dar nu influențează respirația mitocondriilor decuplate.

În lanțul respirator există deci trei locuri de fosforilare, locuri în care trecerea a doi electroni dă naștere la o moleculă de ATP. O problemă fundamentală de bioenergetică este mecanismul molecular prin care energia eliberată prin transportul electronilor este utilizată în sinteza ATP din ADP și fosfat anorganic.

Teoria chemiosmotică, elaborată în 1961 de Mitchell, distins cu premiul Nobel în 1978, este astăzi unanim acceptată ca explicație a mecanismului fosforilării oxidative. Mitchell ia în considerare faptul că în timp ce electronii se scurg în mod continuu prin lanțul respirator trecînd de la o componentă la următoarea, transportul protonilor este discontinuu: numai în unele etape sînt preluați și protoni care sînt transportați cu electronii, iar ulterior protonii sînt eliberați. Mitchell a sugerat că reacțiile de transport ale protonilor au loc în așa fel în membrana internă a mitocondriei, încît fixarea protonilor are loc întotdeauna pe o față a membranei, pe cînd eliberarea protonilor se produce pe cealaltă față. Dacă membrana este impermeabilă pentru protoni înseamnă că prin activitatea lanțului respirator se pompează protoni dintr-o parte în alta a membranei. Rezultatul este crearea unui *gradient electrochimic de protoni* prin membrana internă mitocondrială avînd două componente: un gradient de pH și un potențial electric de membrană (interiorul devine negativ).

Ambele componente ale gradientului electrochimic de protoni acționează în sensul atragerii protonilor în matrice, deci gradientul exercită o forță *protonmotrice*, care se poate măsura în mV. Protonii trec înapoi în matrice prin ATPsintetază, care, ca o turbină ce convertește o formă de energie în alta, sintetizează ATP din ADP și fosfat anorganic (Pi) într-o reacție cuplată cu fluxul protonilor spre interiorul mitocon-

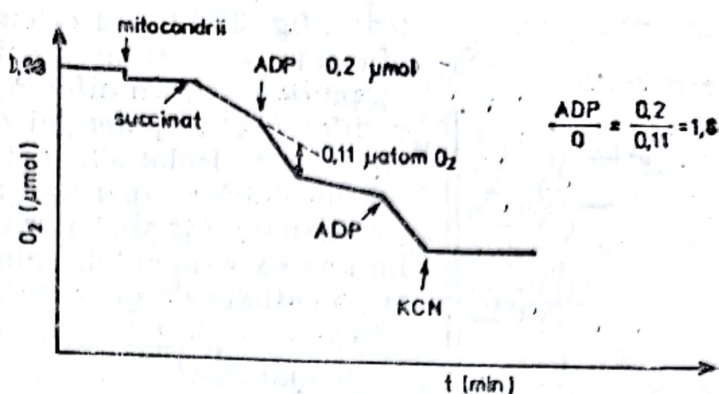


Fig. 22.7. Determinarea polarografică a consumului de oxigen mitocondrial (cu succinat ca substrat) și a raportului ADP : O (exprimat prin numărul de μ moli AD sintetizat/numărul de μ atomi de oxigen consumat). P

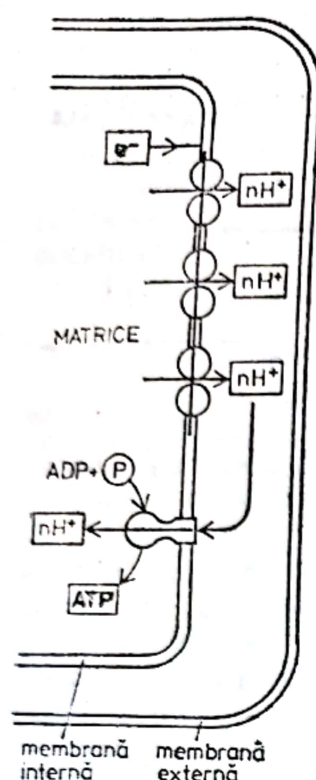


Fig. 22.8. Forța protonmotrice determină ATPaza să sintetizeze ATP.

driei (fig. 22.8.). S-a calculat că în cazul funcționării eficiente a lanțului respirator forța protonmotrice ar putea realiza o diferență de pH de 3,5 unități sau o diferență de potențial de 220 mV. Ambele valori considerate izolat sînt nefiziologice, dar o combinație a celor două componente în limitele fiziologice poate corespunde atât valorilor calculate, cît și celor determinate experimental, anume un gradient de pH —1 și potențialul de membrană de 160 mV.

Cum se produce sinteza ATP ca urmare a forței protonmotrice?

Reacția catalizată de ATPază este:



În timp ce hidroliza ATP este o reacție exergonică, sinteza sa din ADP și P_i este endergonică. Mitchell consideră că gradientul de protoni furnizează energia necesară deplasării echilibrului reacției de mai sus în sensul sintezei de ATP. ATPaza, localizată în sferele de pe fața M a membranei interne, catalizează în acest caz condensarea unei molecule de ADP cu o moleculă de fosfat anorganic, deci sinteza de ATP prin deshidratare. Datorită gradientului de protoni îndepărtarea moleculei de apă se face prin mișcarea vectorială a H^+ spre matrice (unde există o concentrație mică de H^+), iar OH^- spre citosol (spre concentrația mare de H^+).

În mod simplificat se poate reprezenta esența teoriei prin schemele din fig. 22.9. și 22.10., una indicînd formarea gradientului de protoni, iar cealaltă sinteza ATP.

Deci cuplarea transportului electronilor cu fosforilarea se realizează, după teoria chemiosmotică, datorită gradientului de protoni (forței protonmotrice) și aceasta explică necesitatea integrității membranei interne. Dacă aceasta devine permeabilă pentru ioni, atunci protonii generați în cursul transportului electronilor se scurg înapoi în matrice și nu se poate forma gradientul necesar fosforilării. De fapt, acesta este mecanismul de acțiune a decuplărilor fosforilării oxidative (DNP), care fiind acizi slabi transportă protonii din citosol în matrice.

Teoria chemiosmotică este susținută de date experimentale.

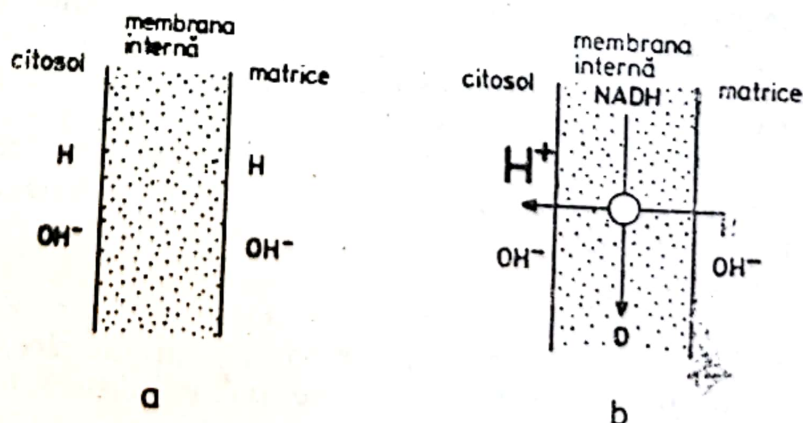


Fig. 22.9. Membrana mitocondrii în absența transportului electronilor (a) și formarea gradientului de protoni concomitent cu transportul electronilor (b).

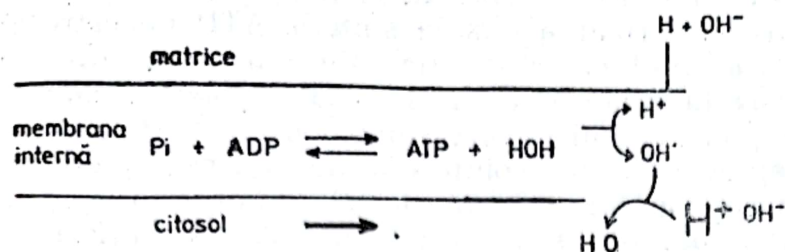


Fig. 22.10. Deplasarea echilibrului reacției catalizate de ATPază datorită gradientului protonic.

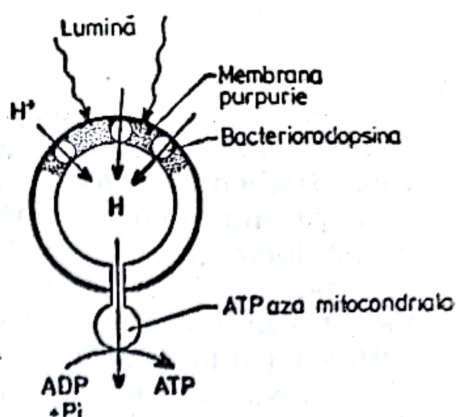
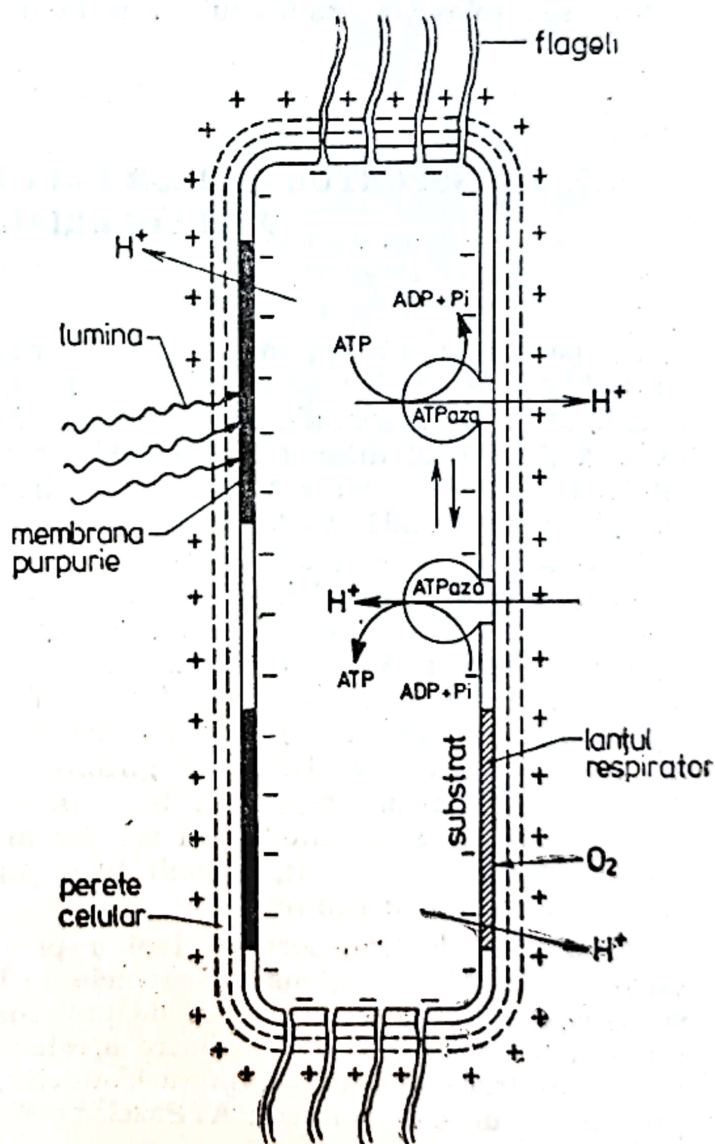


Fig. 22.11. Schema experienței lui Racker și Stoeckenius prin care s-a sintetizat ATP prin expunerea la lumină a unor membrane artificiale în care s-a încorporat membrana purpurie a bacteriei *H. halobium* și ATPaza mitocondrială.

Astfel, respirația mitocondriilor este însoțită de acidifierea mediului extern, deci o expulzare a protonilor. De asemenea s-au putut evidenția și potențiale de membrană mitocondriale. Cea mai concludentă dovadă este socotită experiența lui Racker și Stoeckenius efectuată pe vezicule fosfolipidice artificiale în a căror membrană s-au încorporat fragmente din membrana purpurie a bacteriei *Halobacterium halobium* și un preparat de ATPază mitocondrială (fig. 22.11.). Membrana purpurie conține lipide în care se află bacteriorodopsina, o proteină care la iluminare funcționează ca o pompă de protoni. În cazul bacteriei vii protonii sînt expulzați de la interiorul spre exteriorul celulei și aceasta generează ATP. (fig. 22.12.). În experiența

Fig. 22.12. Membrana bacteriei *Halobacterium halobium*, cu indicarea zonei de membrană purpurie în care se află bacteriorodopsina și cu ATPaza reversibilă.



menționată bacteriorodopsina a dus la captarea protonilor în vezicule (bacteriorodopsina fiind orientată invers față de situația din bacterie). Gradientul protonic astfel format a dus la sinteza ATP de către ATPaza mitocondrială. Mecanismul chemiosmotic este universal, întâlnit în toate celulele, inclusiv la bacterii. Unele bacterii aerobe au lanț respirator în membrana plasmatică similar cu cel mitocondrial. Altele au lanț respirator avînd acceptor final un compus azotat (nitrat, nitrit), sulfurat (sulfat, sulfit) sau compuși organici (fumarat). Transportorii de e^- sînt similari celor din mitocondrii sau acceptorul final este diferit de oxigen. În ambele cazuri există o ATPază ce sintetizează ATP prin mecanismul chemiosmotic. La alte bacterii anaerobe la care lipsește lanțul respirator, ATP-ul rezultat din glicoliză este folosit parțial pentru a pompa H^+ la exterior și a crea gradientul electrochimic de H^+ , folosit pentru procese de transport ale aminoacizilor, glucidelor sau pentru transportul Na^+ , care este pompat în afară de către un sistem antiport $Na^+ - H^+$.

Deci ATPaza este reversibilă, poate folosi ATP-ul pentru a pompa protoni sau folosește gradientul de protoni pentru sinteza ATP-ului.

22.5. TRANSPORTUL IONILOR PRIN MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIALĂ

După cum s-a spus, membrana externă mitocondrială permite trecerea liberă a ionilor și moleculelor mici, fiind impermeabilă pentru macromolecule. În schimb, membrana internă mitocondrială este impermeabilă (în sensul difuziunii directe), dar pentru îndeplinirea funcțiilor celulei este absolut necesară trecerea ionilor prin membrana internă mitocondrială. De pildă ATP se formează în matrice, pe baza ADP-ului și a P_i venit din citosol, iar ATP-ul format este necesar în citosol, fiind sursa energetică a celulei. Mitocondriile mențin un depozit de ATP în celulă, folosit în procesele celulare, la fel cum o baterie pune în mișcare un motor electric. Mitocondriile „reîncarcă bateria de ATP” a celulei. Pe de altă parte, datorită localizării intracelulare a enzimelor diferitelor căi metabolice, substratele acestor enzime trebuie să străbată membrana internă mitocondrială. De pildă glicoliza este localizată în citosol, pe cînd piruvatul rezultat este oxidat prin ciclul acizilor tricarboxilici în matrice; biosinteza acizilor grași are loc în citosol, iar oxidarea acizilor grași în matrice. În sfîrșit, cationii, în primul rînd Ca^{2+} , sînt și ei transportați în mitocondrii în mod specific.

Procese de transport ale ionilor prin mitocondrii au deci importanță fiziologică excepțională. Sistemele de transport sînt foarte specifice și transportorii sînt reprezentați de proteine localizate în membrana internă a mitocondrii. Unele dintre acestea au fost izolate și purificate, cum este transportorul adeninnucleotidelor, de 29.000 daltoni, existînd probabil ca un dimer asociat ATPazei.

Există mai multe sisteme pentru transportul ionilor, localizate în membrana internă mitocondrială, majoritatea fiind exemple de difuziune facilitată.

1. Transportul adeninnucleotidelor se realizează prin schimbul între o moleculă de ADP, care trece prin citosol în mitocondrii, cu o moleculă de ATP ce trece din mitocondrii în citosol. Transportul este inhibat specific de către atractilozid, o glucidă, iar procesul de transport este reprezentat în fig. 22.13. În corpul uman o moleculă de ATP intră și iese din mitocondrii de mii de ori pe zi, menținându-se astfel concentrația de ATP a celulei de 5—10 ori mai mare ca cea a ADP-ului.

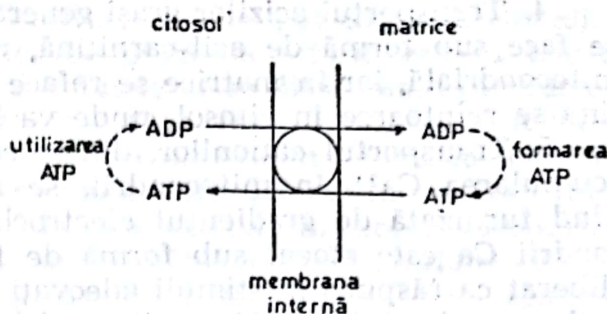


Fig. 22.13. Transportul adeninnucleotidelor prin membrana internă mitocondrială.

2. Transportul altor anioni din citosol în matrice: fosfatul, care este utilizat în sinteza ATP, piruvatul, care este utilizat în ciclul citric. Acestea sunt transportate în simport cu H^+ , deci consumă o parte din gradientul electrochimic al membranei.

3. Transportul de schimb al unor anioni: de pildă glutamatul din citosol este schimbat cu aspartatul din matrice. Acest proces are mare importanță în transferul unor echivalenți reducători din citosol în matrice. Astfel, membrana internă mitocondrială este impermeabilă pentru NADH, totuși NADH-ul trebuie să fie oxidat în lanțul respirator mitocondrial. Transferul NADH-ului din citosol în matrice se realizează nu prin trecerea NADH-ului însuși, ci a unor echivalenți reducători ai NADH-ului, adică metaboliți ce preiau hidrogenii de la NADH în citosol și îi transportă în matrice unde îi cedează NAD^+ generând NADH. Astfel, NADH-ul din citosol este oxidat de către malatdehidrogenază, care transformă oxaloacetatul în malat. Malatul este transportat prin membrana mitocondrială în matrice, unde este convertit în oxaloacetat de către malatdehidrogenaza din matrice, cu reducerea concomitentă a NAD^+ la NADH. Oxaloacetatul din citosol este refăcut prin transaminarea aspartatului cu oxoglutarat (generat în mitocondrie prin transaminarea glutamatului cu oxaloacetat). Funcționarea întregului ciclu (ciclul Borst) este dependentă de trei sisteme de transport: al malatului, al oxoglutaratului și transportul de schimb glutamat-aspartat (fig. 22.14.).

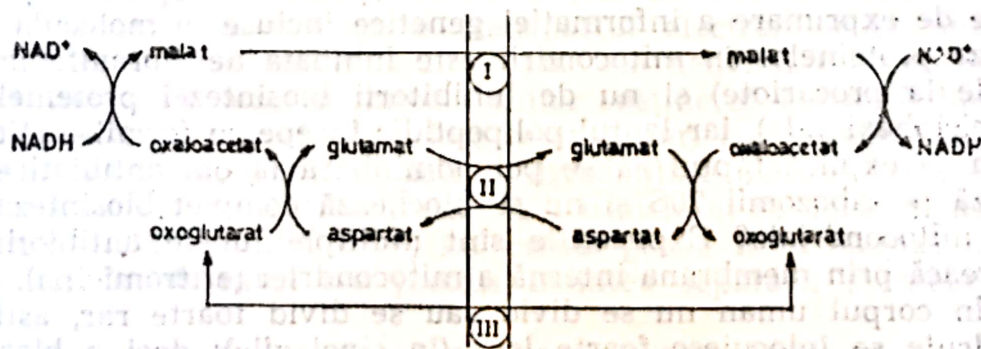


Fig. 22.14. Ciclul Borst.

4. Transportul acizilor grași generați în citosol sub formă de acil-CoA se face sub formă de acil-carnitină, care trece prin membrana internă mitocondrială, iar în matrice se reface acil-CoA (ce vor fi oxidați); carnitina se reîntoarce în citosol, unde va lega o nouă moleculă de acil-CoA.

5. Transportul cationilor, dintre care cel mai important proces este acumularea Ca^{2+} în mitocondrii, se face prin transport activ, energia fiind furnizată de gradientul electrochimic sau de către ATP. În mitocondrii Ca este stocat sub formă de fosfat de calciu, de unde poate fi eliberat ca răspuns la stimuli adecvați (de pildă cAMP). În acest fel acumularea calciului de către mitocondrii este un proces important în controlul concentrației Ca^{2+} în citosol, ionul de Ca^{2+} controlând numeroase procese metabolice. Procesele de transport ale ionilor se află în competiție cu ATP-sintetaza pentru folosirea gradientului electrochimic. Dacă se folosește mai mult pentru transport de ioni, scade sinteza de ATP; de pildă adaosul in vitro de ioni de Ca^{2+} la mitocondrii blochează sinteza de ATP.

22.6. BIOGENEZA ȘI ORIGINEA EVOLUȚIONARĂ A MITOCONDRIEI

Biogeneza mitocondrii, organit complex, prezent în toate celulele eucariote, este o problemă pasionantă de biologie celulară. Compoziția lipidică distinctă a membranei interne, dar mai ales faptul că mitocondriile au ADN și un sistem propriu de biosinteză a proteinelor conferă mitocondriilor o autonomie, în sensul că o parte din componentele noi adăugate unei mitocondrii preexistente sînt sintetizate chiar în mitocondrii.

ADN-ul mitocondrial este de regulă circular, existînd unul (la mamifere) sau mai multe (5—10) inele într-o mitocondrie la animale și 20—80 molecule la plante, putînd codifica 30—50 proteine mici. Acest ADN se replică și este transcris în mRNA. În matricea mitocondrii există ribozomi, care diferă de cei din citosol, fiind mai mici și prin aceasta se apropie (fără a fi identici) de ribozomii procariotici. Pe lângă mRNA există și tARN și toate enzimele necesare biosintezei proteinelor. Prin urmare mitocondriile conțin ADN capabil de replicare și toate sistemele de exprimare a informației genetice incluse în molecula ADN. Biosinteza proteinelor în mitocondrii este inhibată de cloramfenicol (ca și cea de la procariote) și nu de inhibitorii biosintezei proteinelor în citosol (cicloheximida), iar lanțul polipeptidic începe cu formil-metionină.

Cum se explică faptul că se pot administra la om antibiotice care acționează pe ribozomii 70S și nu se blochează complet biosinteza proteinelor mitocondriale? Explicațiile sînt multiple: unele antibiotice nu pot să treacă prin membrana internă a mitocondrii (eritromicina). Unele celule din corpul uman nu se divid sau se divid foarte rar, astfel că mitocondriile se înlocuiesc foarte lent (în cinci zile); deci o blocare a sintezei proteinelor mitocondriale trebuie menținută multe zile pentru

a deprima sever mitocondriile. Condițiile locale pot împiedica medicamentul să atingă celulele sensibile. De pildă Ca^{2+} formează cu tetraciclina complexe care nu pot intra în celulele ce se divid rapid (precursorii eritrocitelor). Totuși la tratamente cu doze mari de cloramfenicol se produce depresia sintezei leucocitelor sau hematiilor în măduva osoasă, iar la tratamentul prelungit cu tetraciclină apar defecte în epiteliul intestinal. Aceste efecte pot fi legate de blocarea biogenezei mitocondriale.

Proteinele sintetizate în mitocondrii sînt foarte hidrofobe. Printre acestea se numără: cele 4 polipeptide din porțiunea ATPazei aflată în interiorul membranei mitocondriale, 3 dintre cele 7 subunități ale citocromoxidazei și apoproteina citocromilor b. Aceste proteine hidrofobe joacă probabil un rol esențial în asamblarea componentelor nou sintetizate în membrana internă a mitocondriei. Celelalte proteine mitocondriale, precum și lipidele, sînt sintetizate în citosol și sînt apoi transferate, „importate” în mitocondrii. Interesant că inclusiv enzimele de replicare a ADN-ului mitocondrial, ARN polimeraza mitocondrială, proteinele ribozomilor și aminoacil-tARN sintetazele sînt sintetizate în citosol și sînt abia pe urmă transferate în mitocondrii. Nu este clar de ce mai există ADN mitocondrial, dacă nucleul conține 90 gene active pentru aceste proteine mitocondriale.

Biogeneza mitocondriei se desfășoară, ca și biogeneza celorlalte membrane celulare, prin inserarea componentelor nou sintetizate într-o membrană preexistentă, deci prin expansiunea membranei preexistente. În cazul mitocondriei este necesar să subliniem, ca particularități, sinteza intramitocondrială a unor componente și diviziunea mitocondriei.

Cum are loc transportul proteinelor mitocondriale produse în citosol? Se consideră că aceste proteine au „secvențe semnal”, fie într-o poziție „leader” (la capătul N-terminal), fie în interiorul lanțului polipeptidic. Aceste secvențe le permit să treacă prin anumite membrane (de exemplu proteinele matricii trebuie să străbată și membrana externă și pe cea internă) sau să rămână într-o membrană. Deci spre deosebire de RE rugos unde avea loc „descărcarea vectorială” în cursul traducerii („import simultan cu traducerea”, „co-translational”), aci (ca și la cloroplaste și peroxizomi) este un „import post-traducere”, („post-translational”). Secvența semnal este scindată atunci cînd proteina ajunge în compartimentul pentru care a fost sintetizată.

Existența ADN-ului și a biosintezei proteice în mitocondrii și asemănările pe care acestea le prezintă cu sistemele corespunzătoare de la procariote au generat discuții interesante privind originea evoluționară a mitocondriei. La procariote transportul electronilor și sinteza ATP sînt localizate în membrana limitantă, ele neavînd mitocondrii. Teoria endosimbiotică a originii mitocondriilor susține că ele ar fi luat naștere printr-o invazie a unei procariote relativ mari anaerobe de către o bacterie mică aerobă. Ulterior bacteria invadantă a pierdut o parte din procesele și genele neesențiale (unele le-a transferat în nucleul gazdei), specializîndu-se în sinteza ATP, iar celula gazdă îi furnizează metaboliții necesari. Evenimentul s-a produs înaintea separării plantelor de animale.

O altă ipoteză susține că mitocondria provine dintr-o invaginare a membranei limitante a celulei procariote, sub forma unei vezicule care

întimplător a inclus o porțiune din ADN-ul celulei, un epizom sau o plasmidă. Prezența mezozomilor și a plasmidelor la bacterii face posibilă și această ipoteză. În prezent nu se poate spune care ipoteză este valabilă, dar este sigur că apariția mitocondriilor a permis evoluția celulelor eucariote cu varietatea mare în care apar eucariotele astăzi.

În ultimii ani genetica mitocondrială a înregistrat progrese spectaculare. S-au elucidat hărțile genetice la o serie de specii, iar din 1981 și la om; secvența completă (de 16.569 nucleotide) a ADN-ului mitocondrial uman conține 2 gene pentru rARN, 22 gene pentru tARN și 13 gene pentru proteine.

Dacă în citoplasmă sînt 31 tARN diferiți, în mitocondrii sînt numai 22. Recunoașterea „codon-anticodon” este mai „relaxată” în mitocondrii, ceea ce face ca în a 3-a poziție din codon să se poată afla oricare bază (vezi ipoteza „wobble” la cap. 12). Codul genetic mitocondrial este diferit de codul „universal” și există chiar diferențe între specii (de exemplu în mitocondriile umane față de cele din drojdii). Există 4 codoni diferiți în codul mitocondrial față de citoplasmă; la om: UGA = Trp; AUA = Met; AGA = AGG = STOP.

Este interesant că la transcrierea ADN-ului mitocondrial se transcriu ambele lanțuri din duplexul de ADN, deci transcrierea este simetrică. Dar ulterior ARN transcris pe un lanț este scindat „asimetric” rezultînd diferite molecule de ARN de pe cele două lanțuri. La drojdii (nu și la om) s-a descoperit că genele mitocondriale au introni, ceea ce este în contradicție cu teoria endosimbiozei. Replicarea ADN-ului mitocondrial nu este limitată la faza S a ciclului celular. Moleculele de ADN par a se replica la întîmplare (unele de două ori, altele deloc într-un ciclu celular), dar în fiecare ciclu celular numărul de molecule de ADN mitocondrial se dublează, menținînd constantă cantitatea de ADN mitocondrial/celulă.

O altă noutate: s-a constatat (prin tehnici de inginerie genetică) faptul că genele mitocondriale provin numai de la mamă. Această descoperire prezintă importanță pentru înțelegerea transmiterii unor boli genetice, cum este boala Leber (atrofia nervului optic ce duce la orbire).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Attardi G., Organization and expression of the mammalian mitochondrial genome: a lesson in economy, *Trends Biochem. Sci.*, 6, 86—89; 100—103, 1981.
2. Benga Gh., Caracterizarea imunochimică a mitocondriilor din ficatul uman, *St. Cerc. Biochim.*, vol. 16, 1973, p. 15—24.
3. Benga Gh., Fractionarea subcelulară a țesutului hepatic uman. I. Izolarea fracțiunii mitocondriale, *St. Cerc. Biochim.*, vol. 17, 1974, p. 123—135.

4. Benga Gh., Fraționarea subcelulară a țesutului hepatic uman. II. Caracterizarea mitocondriilor în condiții patologice, *St. Cerc. Biochim.*, vol. 18, 1975, p. 83—91.
5. Benga Gh., Molecular composition and functional properties of human liver mitochondria, in: *Membrane Processes. Molecular Biology and Medical Applications* (Gh. Benga, H. Baum, F. A. Kummerow, eds), Springer Verlag, New York, 1984.
6. Benga Gh., Borza V., Differences in reactivity of cytochrome oxidase from human liver mitochondria with horse and human cytochrome c, *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 169, 1975, p. 354—357.
7. Benga Gh., Dancea S., Comparative Electron Microscopic aspects of human liver mitochondria in situ and isolated in suspensions, *Morphol. Embryol.*, vol. 25, 1979, p. 205—208.
8. Benga Gh., Ferdinand W., Increased content of hydrophobic amino acid residues in lipid-rich mitochondrial membranes, *International J. Biochem.*, vol. 8, 1977, p. 17—20.
9. Benga Gh., Hodârău A., Böhm B., Borza V., Tilinca R., Dancea S., Petrescu I., Human liver mitochondria: relation of a particular lipid composition to the mobility of spin-labeled lipids, *European J. Biochem.*, vol. 84, 1978, p. 625—633.
10. Benga Gh., Hodârău A., Tilinca R., Poruțiu D., Dancea S., Pop V. I., Wrigglesworth J., Fractionation of human liver mitochondria. Enzymic and morphological characterization of the inner and outer membranes as compared to rat liver mitochondria, *J. Cell Science*, vol. 35, 1979, p. 417—429.
11. Benga Gh., Mureșan L., Human liver mitochondria. III. ATPase activity as an index of mitochondrial damage, *Biochem. Med.*, vol. 10, 1974, p. 131—145.
12. Benga Gh., Mureșan L., Hodârău A., Dancea S., Conditions for isolation and study of enzymic properties of human liver mitochondria, *Biochem. Med.*, vol. 6, 1972, p. 508—521.
13. Benga Gh., Tilinca R., Hodârău A., Băltescu V., Borza V., Alcalovschi I., Fraționarea subcelulară a ficatului uman. Determinarea activității adenilat kinazei, *Clujul Medical*, vol. 51, 1978, p. 41—46.
14. Benga Gh., Petrescu I., Țărmure C., Pop V. I., Species related functional properties of mitochondria comparison between rat and human liver mitochondria, *Rev. roum. biol. Biol. Anim.*, vol. 2, 1980, p. 147—154.
15. Giles R. E., Blanc H., Cann H. M., Wallace D. C., Maternal inheritance of human mitochondrial DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6715—6719, 1980.
16. Kuroiwa T., Mitochondrial nuclei, *Int. Rev. Cytol.*, 75, 1—59, 1982.
17. Mitchell P., Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature*, 191, 144—148, 1961.
18. Mitchell P., The correlation of chemical and osmotic forces in biochemistry, *J. Biochem.*, 97, 1—18, 1985.
19. Neupert W., Schatz G., How proteins are transported into mitochondria, *Trends Biochem. Sci.*, 6, 1—4, 1981.
20. Racker E., Stoeckenius W., Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation, *J. Biol. Chem.*, 249, 662—663, 1974.
21. Whittaker P. A., Danks S. M., *Mitochondria: structure, function and assembly*, Longman, London, 1978.

23. MATRICEA EXTRACELULARĂ ȘI ADEZIVITATEA CELULARĂ

23.1. RELAȚIA STRUCTURĂ-FUNCȚIE

Toate celulele organismelor pluricelulare ce formează *țesuturi* se află în contact cu o rețea intricată de macromolecule numită *matricea extracelulară* și care ocupă *spațiul interstițial* (dintre celule) continuându-se cu glicocalixul. Din această matrice se formează și structuri specializate: membranele bazale, cartilagiile, tendoanele, iar după depunerea de cristale de fosfat de calciu se formează oasele și dinții.

Adeseori se folosește numele de *țesut conjunctiv* pentru matricea extracelulară împreună cu celulele aflate în ea: fibroblaste, macrofage, mastocite. Cantitatea de țesut conjunctiv din diferite organe variază foarte mult: este abundent în piele și oase și foarte puțin în creier. De asemenea variază cantitatea și tipul de macromolecule prezente, în funcție de adaptările particulare la funcțiile organului respectiv.

Matricea extracelulară îndeplinește *roluri* multiple: a) stabilizează structura fizică a țesuturilor; b) rol de lubrefiere, amortizarea șocurilor mecanice și asigurarea elasticității țesuturilor și organelor; c) rol în adezivitatea celulară (fiind un „clei universal intercelular“); d) influențează forma celulei, proliferarea, migrarea și dezvoltarea celulelor în evoluția embrionului; e) rol metabolic. Deci matricea extracelulară este o structură dinamică, activă, în interrelație cu celulele, și nu are numai rolul mecanic, inert, atribuit uneori de histologia clasică.

23.2. COMPOZIȚIA CHIMICĂ

Îndeplinirea funcțiilor amintite este posibilă datorită compoziției matricii extracelulare. În esență ea constă dintr-o *rețea de proteine fibroase cufundate într-un gel hidratat de polizaharide*. Proteinele asigură organizarea matricii și îi dau rezistență și elasticitate, în timp ce gelul de polizaharide permite (prin faza sa apoasă aflată în ochiurile gelului) difuziunea substanțelor nutritive, a metabolitilor și hormonilor între sînge și celulele din țesuturi. Componentele matricii celulare sînt secrete de către celulele aflate în ea.

Proteinele din matricea extracelulară sînt: colagenul, elastina, fibronectina și laminina (aceasta din urmă numai în membranele sau lamele bazale).

Colagenul este proteina cea mai abundentă din organismul mamiferelor: 25% din totalul proteinelor. De fapt este o familie de proteine fibroase ce au ca trăsătură caracteristică structura formată din trei lanțuri răsucite într-un triplu helix (ca într-o frînghie). Lanțurile se numesc α și pot fi de 7 tipuri diferite. Combinațiile lor ar putea da multe molecule diferite, dar întâlnim în realitate doar 5 tipuri de molecule de colagen. Fiecare moleculă are lungimea de 300 nm și diametrul de 1,5 nm. Caracteristic pentru colagen este conținutul mare în glicină și prolină precum și de hidroxiprolină și hidroxilizină. Mai mult, în secvență glicina se repetă la fiecare a treia poziție. Glicina este singurul aminoacid suficient de mic pentru a ocupa spațiul de la interiorul triplului helix, pe de altă parte, hidroxilizina și hidroxiprolina formează legături de hidrogen între lanțurile α stabilizând molecula. În scorbut (deficit de vit. C) prolină nu este hidroxilată și lanțurile sînt degradate în celulă, astfel că pielea și vasele sanguine devin extrem de fragile. Hidroxilarea lizinei este necesară și pentru că de hidroxilizină se leagă grupări glucidice (dizaharide).

Sinteza colagenului are loc în ribozomii atașați RE sub formă de prolanțuri α , care sînt apoi hidroxilate, glicozilate și se asociază cîte trei formînd molecula de procologen (proces ce se întîmplă în RE și aparatul Golgi). După secreția la exteriorul celulei, are loc tăierea unor peptide de la capetele moleculelor, apoi acestea se așază paralel, iar între ele se stabilesc legături covalente, ce determină formarea microfibrilelor; acestea la rîndul lor așezate în mănunchiuri formează fibrila de colagen. Mănunchiurile de fibrile formează fibrele de colagen vizibile la microscopul optic.

Este clar că o asemenea structură posedă o rezistență mecanică mare, în special la tracțiune, necesară funcției (să ne gîndim la forța la care este supus tendonul lui Achile).

Elastina este și ea bogată în prolină și glicină (nehidroxilate). Secretează în spațiul extracelular, moleculele alungite de elastină se leagă într-o rețea. Fiecare moleculă fiind încolăcită la întîmplare („random-coil”), rețeaua ce se realizează (sub formă de fibre sau foițe) are elasticitatea cauciucului fiindcă „ochiurile” plasei își modifică forma după direcția forței. Este bine reprezentată în piele, vase sanguine și plămîni.

Polizaharidele din matricea extracelulară sînt de un tip special: mucopolizaharide sau, după denumirea mai nouă, glicozaminoglicani (fiindcă unitatea ce se repetă în polimer este un dizaharid în care a doua componentă este întotdeauna o glucidă aminată: N-acetilglucozamina, N-acetilgalactozamina). Există 7 tipuri de glicozaminoglicani: a. hialuronic, condroitin 4-sulfatul, condroitin 6-sulfatul, dermatan sulfatul, heparan sulfatul, heparina și keratan sulfatul. În afară de a. hialuronic celelalte macromolecule se leagă și de lanțuri polipeptidice formînd proteoglicani (sau mucoproteine) în care 90—95% din greutate este componenta glucidică (spre deosebire de glicoproteine, care au 1—60% glucide). Aceste molecule adoptă conformații destinate la întîmplare („random-coil”), ocupînd spații mari și sînt foarte hidratate (vezi și cap. 3).

A. hialuronic pare să joace un rol special în dezvoltarea embrionului și în repararea rănilor. Producția locală de acid hialuronic se pare că facilitează migrarea celulelor în timpul morfogenezei și vindecarea rănilor.

23.3. FIBRONECTINA ȘI ADEZIVITATEA CELULARĂ

Fibronectina este o glicoproteină (cu 50% glucide) formată din două subunități identice liniare legate cap la cap (fiecare cu greutate moleculară de 220.000 daltoni). Această proteină are rol esențial în adezivitatea celulelor, ea formând agregate în spațiul extracelular (se mai poate găsi și în sânge și alte fluide).

Rolul său în adezivitatea celulară a fost relevat de studiul celulelor în cultură, unde fibronectina a fost găsită pe suprafața fibroblastelor. Dimpotrivă, pe fibroblastele din tumori (deci pe suprafața celulelor maligne) fibronectina este mult redusă, ceea ce a fost pus în legătură cu: adezivitatea scăzută a celulelor maligne, capacitatea lor de a invada țesuturile producând tumori și de asemenea capacitatea de a da tumori secundare (metastaze).

Celulele maligne în cultură aderă slab de suport, sînt rotunde, proliferază în mai multe straturi. Dacă li se adaugă fibronectină se modifică forma (devine stelată ca la fibroblastele normale), aderă de suport, dar se menține proliferarea anormală. Deci fibronectina influențează adezivitatea, dar nu și proliferarea celulară.

Fiind găsită în cantitate mare în regiunile unde au loc migrări celulare în cursul dezvoltării embrionului, se consideră că fibronectina influențează migrarea celulară *in vivo* tocmai prin influența ei asupra adezivității celulare. Adezivitatea se poate măsura prin forța necesară pentru a dezlipi două celule.

S-au descris și *molecule specifice adeziunii celulare* („cell adhesion molecules“) dar mecanismul de acțiune încă nu este clar.

23.4. MEMBRANA BAZALĂ CA SPECIALIZARE A MATRICII EXTRACELULARE

Membrana bazală (sau lamina bazală) este o structură specială situată sub celulele epiteliale (separîndu-le de țesutul conjunctiv subiacent), interpusă între două straturi unicelulare în glomerulii renali, sau înconjurînd celule individuale (musculare, adipoase, celule Schwann).

Membrana bazală este produsă prin secreție de celulele ce stau pe ea; compoziția chimică variază după țesut, dar cuprinde collagen de tipul IV, proteoglicani, fibronectină și o glicoproteină cu greutate moleculară mare (formată dintr-o subunitate de 220.000 și alta de 440.000 daltoni) numită *laminină*.

Funcțiile membranei bazale sînt multiple și probabil încă insuficient elucidate. În glomerulii renali acționează ca un filtru semipermeabil reglînd trecerea macromoleculelor din sânge în urină. În epiteliu este o barieră celulară, oprind trecerea fibroblastelor, dar permite trecerea macrofagelor și limfocitelor.

Membrana bazală joacă rol important în regenerarea ţesuturilor după leziuni. Dacă se produc distrugerii ale muşchilor, nervilor şi epitelilor, membrana bazală rămasă funcţionează ca un suport („eşafod”) pentru migrarea celulelor în cursul regenerării. Membrana bazală care înconjoară celula musculară are rol important în regenerarea joncţiunii neuromusculare la distrugerea celulei musculare, a axonului sau chiar a ambelor structuri! În acest ultim caz membrana bazală de la nivelul joncţiunii „ghidează” atât celula musculară în regenerare, cât şi regenerarea axonului spre refacerea structurii, inclusiv a joncţiunii. Aceasta sugerează că matricea extracelulară joacă un rol important în procesele de recunoaştere celulară, inclusiv cele din dezvoltarea embrionului.

Îngroşarea membranei bazale a glomerulului renal cu scăderea capacităţii de filtrare s-a descris în diabetul zaharat şi nefroză. De asemenea interacţiunea bacteriilor cu membranele bazale renale ar avea rol în iniţierea pielonefritei.

23.5. INTERACŢIUNI RECIPROCE ÎNTRE CELULE ŞI MATRICEA EXTRACELULARĂ

Experienţe pe fibroblaste în cultură au pus în evidenţă influenţa citoscheletului asupra componentelor matricii extracelulare (care de fapt sînt şi componente ale glicocalixului). Dacă se vizualizează fibronectina pe suprafaţa fibroblastelor şi filamentele de actină la interior (prin anticorpi fluorescenţi) se observă că ambele categorii de filamente sînt dispuse pe aceleaşi direcţii. Dacă celulele sînt tratate cu citocalazină, care dezorganizează filamentele de actină, se observă disocierea filamentelor de fibronectină de pe suprafaţa celulei. La fel şi moleculele de collagen secretate de celulă sînt aranjate paralel cu microfilamentele.

Invers, matricea extracelulară influenţează forma, mişcările, metabolismul şi diferenţierea celulelor în cultură. De pildă celulele epiteliale corneene cultivate pe suprafeţe sintetice secretă puţin collagen şi proteoglicani; cultivate pe membrana bazală aceleaşi celule secretă cantităţi mari de macromolecule ale matricii. Celulele epiteliale cultivate pe suprafeţe sintetice au suprafaţa bazală neregulată şi citoscheletul de la interior dezorganizat; aceleaşi celule cultivate pe membrană bazală sau pe macromolecule din matrice au suprafeţele bazale netede şi citoscheletul bine organizat (ca în ţesutul intact).

Aceste relaţii reciproce între citoschelet şi matricea extracelulară, ce se propagă prin plasmalemă, pot servi în principiu la „ordonarea” celulelor în cursul dezvoltării organelor şi ţesuturilor.

Este posibil ca receptori din plasmalemă să medieze aceste interacţiuni dintre matricea extracelulară şi citoschelet.

24. RECUNOAȘTEREA CELULARĂ, CELULA MALIGNĂ, ÎMBĂTRÎNIREA CELULARĂ

Așa cum s-a spus și anterior celulele interacționează între ele, iar organismele superioare multicelulare sînt unități în care funcțiile organismului și ale celulelor sînt coordonate complex, pe cale nervoasă și umorală, aspecte studiate de fiziologie. Acest aspect al unității întregului organism nu trebuie pierdut din vedere nici atunci cînd studiem biologia celulară și moleculară. Altfel, cădem în greșeala pe care atît de plastic o exprima Engels: „a vedea copacii și a nu vedea pădurea“.

Există o serie de observații care arată că celulele posedă capacitatea de a se recunoaște unele pe altele în mod specific. Astfel, dacă embrionul de găină este disociat în celule independente (prin tratament cu tripsină), după cîteva ore se observă agregarea celulelor aflate în suspensie. Dacă se amestecă celule ectodermice și mezodermice, la început se formează un conglomerat sferic, dar după 1—2 zile celulele se separă după tip, cele mezodermice la interior, cele ectodermice la exterior. Deci celulele de același tip se recunosc unele pe altele. Fenomenul se datorează glicoproteinelor aflate în membrana citoplasmatică, care formează structuri specifice, capabile de a transmite informația biologică. Tot prin glicoproteine specifice se explică și atașarea spermatozoidului de ovul.

Fenomenul recunoașterii celulare s-a evidențiat și la celulele normale în cultură, la care apare așa-numita *inhibiție de contact*. Astfel, dacă se cultivă celule pe o placă Petri, multiplicarea celulelor are loc pînă în momentul cînd suprafața plăcii a fost acoperită cu un strat monocelular. (fig. 24.1.). Prin urmare contactul cu peretele lateral al vasului și cu celulele vecine oferă celulei informația necesară pentru oprirea diviziunii.

Caracteristic pentru celulele maligne și cele transformate este lipsa inhibiției de contact. Dacă celulele maligne sau cele transformate sînt cultivate într-o placă Petri, diviziunea celulară nu se oprește cînd suprafața plăcii este acoperită complet de un strat monocelular (ca la celulele normale), obținîndu-se mai multe straturi de celule suprapuse (fig. 24.1.).

Transformarea celulelor se obține prin tratarea lor cu unele virusuri, carcinogeni chimici sau raze X. Chiar și

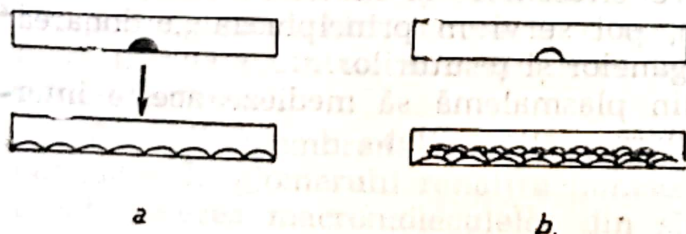


Fig. 24.1. Proliferarea în cultură a celulelor normale (a) și transformate malign (b).

în culturile de celule normale apar spontan câteva celule transformate. Definirea transformării este dificilă. Astfel, pierderea inhibiției de contact nu este un criteriu suficient. Nici capacitatea de a da tumori după injectarea la animale, cum se întâmplă în cele mai multe cazuri, nu este suficientă, fiindcă nu se produc întotdeauna. În general, transformarea se definește pe baza unor modificări morfologice și de colorabilitate a celulelor. Celulele transformate se utilizează experimental presupunând că datele obținute cu ele se pot aplica și celulelor tumorale propriu-zise.

Prin anii 1960 Aub a descoperit că celulele transformate și cele maligne au încă o proprietate ce le distinge pe cele normale, pe lângă inhibiția de contact. Ele sînt aglutinate de către proteine vegetale numite lectine (*fitohemaglutinine*), cum este aglutinina din germenii de grâu, o glicoproteină cu $GM = 17.000$. Se pare că aceasta posedă două capete cu locuri active care leagă printr-o punte celulele pe care le aglutinează. Mecanismul aglutinării nu este încă clar, dar și el denotă modificări în glicoproteinele și glicolipidele din membranele celulelor transformate și tumorale, modificări studiate și prin dozări biochimice.

Modificările de membrană nu pot fi socotite cheia comportării celulelor maligne, deoarece modificările de suprafață sînt numai secundare modificărilor în exprimarea genelor, iar genele determină compoziția și proprietățile suprafeței celulare. Ceea ce este caracteristic celulelor maligne este capacitatea lor de creștere autonomă, adică ele cresc și se reproduc independent de mecanismele normale de reglare. Cercetările privind cauza cancerului (sau cauzele cancerelor) au arătat că o serie de agenți fizici, chimici sau biologici (virusuri) pot produce cancer.

În 1969 Huebner și Todaro au propus un model al genezei cancerelor, după care în toate celulele normale ar exista un virus integrat în cromozomi (provirus). La un moment dat se produce depresia uneia din genele virale, *oncogenele*, care codifică proteine ce pot să transforme o celulă normală într-una malignă.

Studiul oncogenelor ia o dezvoltare foarte mare după 1975 cînd s-au caracterizat în termeni moleculari oncogenele virusurilor cu ARN ce produc tumori maligne la animale. S-au determinat care sînt aceste gene pentru fiecare virus, s-a studiat secvența lor de nucleotide, s-au izolat proteinele codificate de oncogene și s-a demonstrat că aceste proteine produc transformarea malignă a celulelor în cultură.

Ultimii ani au adus însă o descoperire deosebit de importantă: s-a constatat că în cromozomii umani există gene care au secvențe foarte asemănătoare cu oncogenele virale (*v-oncogene*) ale virusurilor cu ARN. Aceste oncogene umane au fost numite *oncogene celulare* (*c-oncogene*). Spre deosebire de modelul original Huebner—Todaro, se știe azi că nu oncogenele celulare provin din cele virale (deci nu sînt virusuri integrate), ci dimpotrivă, virusurile au preluat din celulele normale aceste oncogene. Dovada: oncogenele se găsesc și la ființe foarte îndepărtate de om: la *Drosophilla* sau chiar la drojdii unicelulare. De aceea oncogenele celulare se mai numesc *proto-oncogene*. Faptul că s-au conservat în evoluție peste un miliard de ani demonstrează că oncogenele au în celula normală funcții foarte importante. Din păcate încă nu se știe ce rol au în celula normală și nici ce este perturbat în exprimarea onco-

genelor cînd se produce cancerul, dar există convingerea unanimă că oncogenele sînt implicate în cancer. Aceasta se bazează și pe faptul că în cancer s-au descris modificări cromozomiale cu translocatii, deci rupturi de cromozomi cu transferul fragmentelor pe alți cromozomi; atunci cînd s-au localizat oncogenele pe cromozomii umani s-a văzut că acestea se găsesc tocmai la locul în care se rup cromozomii sau în fragmentele translocate. Aceasta sugerează că exprimarea oncogenelor este asociată cu modificări „vizibile” în cromozomi!

S-au descoperit 18 proto-oncogene, care se pot împărți în două clase: *myc* și *ras*. Genele *myc* par să codifice proteinele nucleare ce reglează transcrierea. Se presupune că proteinele codificate în genele *myc* induc transcrierea unor gene esențiale, critice, pentru proliferarea celulară.

Proteinele codificate de oncogenele *ras* sînt localizate în citoplasmă, probabil pe suprafața internă a plasmalemei. Par a fi implicate în modificările de formă și adezivitate a celulelor maligne, ca și în recepționarea unor semnale de creștere. Se pare că o celulă devine transformată fiindcă secretă în exces un factor stimulator al creșterii celulare. Acest factor acționează apoi pentru a suprastimula creșterea celulei ce l-a eliberat. Este un mecanism „autocrin”. Pe de altă parte este posibil și ca receptorii pentru factorii de creștere din membrana celulară să fie alterați. Iată deci cum s-ar îmbina mecanismele genetice cu modificările de membrană caracteristice la celulele maligne sau transformate.

Date recente sugerează că o singură oncogenă nu poate produce cancer. Este necesară colaborarea mai multor oncogene pentru a se produce cancerul. Aceasta este în concordanță cu carcinogeneza naturală, care apare ca un proces multi-stadial (ce se produce în etape). S-ar putea ca în fiecare din etape să fie activate noi oncogene. Se lucrează intens în acest domeniu, sperîndu-se ca să se identifice mecanismele moleculare ale malignizării și locul unde acestea vor putea fi întrerupte prin terapie. Probabil că adevărata terapie a cancerelor va fi cea bazată pe biologia moleculară.

Biologia celulară și moleculară oferă perspective revoluționare și în altă problemă biomedicală cu profunde implicații teoretice și practice, aceea a îmbătrînirii.

În viața multor celule se pot distinge următoarele stadii (faze), vizibile prin microcinematografie: 1) stadiul de funcționare normală; 2) îmbătrînirea (senescența); 3) agonia; 4) moartea celulară.

Principalele modificări morfologice ale celulelor îmbătrînite sînt următoarele: 1) scăderea volumului celular; 2) scăderea ritmului mitotic și creșterea coeficientului de celule moarte; 3) modificări nucleare; a) retractorarea și condensarea nucleilor, care sînt intens colorați (hipercromi), cu detaliile de structură dispărute, aspect numit *picnoză nucleară*; b) *carioriza*, dispariția („dizolvarea”) nucleului; c) *cariorexis*: fragmentarea nucleului; 4) modificări citoplasmice: scăderea bazofiliei citoplasmei, acumularea de pigmenti și lipide, vacuolizarea citoplasmei.

În stadiul de agonie se pot observa: 1) modificări nucleare similare celulelor îmbătrînite; 2) modificări ale organitelor citoplasmice cu eliberare de fosfolipide și formarea de „figuri mielinice”; 3) modificări ale curenților citoplasmatici și ale mișcărilor pseudopodelor ce au aspecte

de mătănni, stea etc. cu modificarea stării coloide a citoplasmei (fluidificare sau gelificare).

Moartea se produce instantaneu, deci se pot observa numai modificările postmortem, caracterizate prin: 1) forma rotundă a celulelor cu retractarea pseudopodelor; 2) colorarea difuză a nucleului și citoplasmei cu coloranți vitali; 3) umflarea și dispariția mitocondriilor; 4) picnoză, cariorexis, carioliză nucleară. Aceste modificări se datorează eliberării enzimelor din lizozomii alterați, ca urmare a încetării circulației și constituie semn cert al morții organismului animal.

Se pare că numai celulele organismelor superioare îmbătrânesc și mor, deoarece bacteriile sau eucariotele simple se divid mereu, atâta timp cât condițiile de mediu sînt favorabile.

Există mai multe ipoteze și teorii privind îmbătrînirea celulară. Acestea se pot grupa în două categorii. Unele teorii consideră senescența celulară ca o consecință a acumulării defectelor genetice, ca urmare a radiațiilor, agenților mutageni sau radicalilor liberi din mediu. Acești factori pot acționa fie asupra ADN-ului însuși, fie asupra diferitelor etape din transcrierea și traducerea informației genetice. Consecința este pierderea treptată a capacității de sinteză a proteinelor și producerea unor „erori”, adică sinteza unor proteine deficitare în funcționalitatea lor. O variantă a teoriei „erorilor” poate fi considerată și teoria invaziei virale a celulelor, senescența fiind o consecință a încorporării ADN-ului viral în genomul celulei. Dar prin astfel de teorii nu putem explica duratele variate de viață ale diferitelor celule: neuronii, celulele musculare, celulele ce secretă zimogene în stomac au o viață egală cu organismul însuși, pe cînd alte celule se reînnoiesc, deci unele mor și altele se nasc. Reînnoirea poate fi lentă (celulele tractului respirator, hepatocitele) sau rapidă (viață sub 30 zile au: celulele epiteliale din piele și cornee, precursorii celulelor albe și roșii din sînge).

Recent s-a elaborat în diferite variante *teoria morții programate a celulelor*, după care fiecare tip de celulă are înscris în programul genetic o anumită durată de viață, după care celula moare. La fel cum celulele au diferite caracteristici morfofuncționale, la fel au și o durată de supraviețuire caracteristică. Experiențele lui Hayflick sînt aduse în sprijinul acestei teorii. Autorul a cultivat fibroblaste din piele și a constatat că cele provenite din țesutul embrionar se divid exact de 50 ori, apoi cultura moare. Dacă se iau fibroblaste de la persoane de diferite vârste, numărul diviziunilor scade treptat cu vârsta (cam cu 0,2 pe an de vîrstă a donorului). Dacă culturile de celule sînt înghețate chiar mai mulți ani, la dezghețare acestea se divid exact de atîtea ori ca și celulele de aceeași generație neînghețate. Se pare că efectul radiațiilor se exclude fiindcă acest efect ar continua și în stare înghețată. De asemenea nu se pot explica rezultatele acestor experiențe prin acumularea de produși toxici în mediul de cultură a celulelor. Explicația posibilă este aceea a morții programate. Dacă aceasta este adevărat se deschid perspective tulburătoare în fața umanității. Pe de o parte, celulele tumorale în cultură sînt imortale, adică pot fi cultivate nedefinit. Descifrarea mecanismului programării morții în celulele normale ne poate da cheia vindecării cancerului. Pe de altă parte, identificînd mecanismul molecular ce programează moartea celulelor, oamenii ar putea interfera în acest

proces extinzând viața omului. Deci teoria morții programate nu trebuie luată ca o predestinare supranaturală și fatalistă, ci dimpotrivă ca baza materială a unui proces natural, cel al îmbătrânirii. Biologia moleculară aduce o notă optimistă și în acest domeniu.

Trebuie însă precizat că între senescenta celulară și îmbătrânirea organismului întreg este o mare diferență. La scara organismului îmbătrânirea este definită ca o creștere a probabilității morții într-un anumit interval de timp. Moartea celulelor în cultură exprimă însă pierderea capacității lor de multiplicare. O extrapolare directă a senescentei și a teoriei morții programate a celulelor la scara organismului este deci greșită, întrucât neglijează aspectele complexe ale interrelațiilor ce caracterizează organismul ca un sistem în care există relații de subordonare între întreg și parte și relații de coordonare între elementele componente.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Chiricuță, I. (sub red.), *Tratat de cancerologie*, Editura Medicală, București, 1984.
2. Garrod D. R., Nicol A., Cell behaviour and molecular mechanisms of cell-cell adhesion, *Biol. Rev.*, 56, 199—242, 1981.
3. Grumet M., Hoffman S., Edelman G. M., Two antigenically related neuronal cell adhesion molecules of different specificities mediate neuron-neuron and neuron-glia adhesion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 267—271, 1984.
4. Hayflick L., The cell biology of human aging, *Sci. Amer.*, 242, 58—65, 1980.
5. Hayflick L., Recent advances in the cell biology of aging, *Mechanisms Ageing Development*, 14, 59—79, 1980.
6. Kleinman H. K., Klebe R. J., Martin G. R., Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells, *J. Cell Biol.*, 88, 473—485, 1981.
7. Schachter H., Glycoproteins: their structure biosynthesis and possible clinical implications, *Clin. Biochem.*, 17, 3—14, 1984.
8. Yamada K. M., Cell surface interactions with extracellular materials, *Ann Rev. Biochem.*, 52, 761—799, 1983.
9. Yoakum G. H. și colab., Transformation of human bronchial epithelial cells transferred by Harvey ras oncogene, *Science*, 227, 1174—1179, 1985.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ GENERALĂ

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York, 1983.
2. Altman P. L., Katz D. D., (eds.), *Cell Biology*, Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, Maryland, 1976, p. 153.
3. Andreicuț Silvia, *Curs de biologie celulară*, Litografia I.M.F., Tirgu-Mures, 1981.
4. Anghel I., Brezeanu, A., Toma, N., *Ultrastructura celulei vegetale*. Editura Academiei R.S.R., București, 1981.
5. Antohi S., Gavrilă L., *Progrese în genetica moleculară*, Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1981.
6. Babu Y. S., Sack J. S., Greenhough T. J., Bugg C. E., Means A. R., Cook W. J., Three-dimensional structure of calmodulin, *Nature*, 315, 37—40, 1985.
7. Bălbăie V., (sub. red.), *Tratat de bacteriologie*, Editura Medicală, București, 1984.
8. Baciș I., *Fiziologie*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1977.
9. Baciș I., Poruțiu, D., Olteanu, A., Transport of carbon particles across the blood capillary wall, *Rev. Roum. Physiol.*, 11, 223—228, 1974.
10. Benga Gh., *Biologia moleculară a membranelor cu aplicații medicale*, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1979.
11. Benga Gh., *Curs de biologie celulară pentru studenții în medicină*, Litografia I.M.F. Cluj-Napoca, 1980.
12. Benga Gh. (ed.), *Structure and properties of cell membranes*, vol. 1—3, CRC Press, Boca Raton, 1985.
13. Benga Gh., Baum H., Kummerow F. A. (eds.), *Membrane Processes. Molecular Biology and Medical Applications*, Springer Verlag New York, 1984.
14. Birchmeier W., Cytoskeleton structure and function, *Trends Biochem. Sci.*, 9, 192—195, 1984.
15. Brisson A., Unwin P.N.T., Quaternary structure of the acetylcholine receptor, *Nature*, 315, 474—477, 1985.
16. Cerutti P. A., Prooxidant states and tumor promotion, *Science*, 227, 375—381, 1985.
17. Chambon P. et. al., Promoter elements of genes coding proteins and modulation of transcription by estrogens and progesterone, *Rec. Progr. Hormone Res.*, 40, 1—42, 1984.
18. Chifu E., *Chimie coloidală*, Editura didactică și Pedagogică, București, 1969.
19. Cotrutz G., Adomnicăi M., Porumb S., Paraschiv S., *Biologie celulară, Ghid de lucrări practice*, Litografia I.M.F. Iași, 1981.

Redactor MONICA CREMENE
Tehnoredactor: A. MOLNAR

Apărut: 1985. Bun de tipar: 25. 11. 1985. Comanda nr. 2641.
Coli de tipar: 17,25 Hîrtia: velină de 70 g/m² Format: 70×100/16

Tiparul executat sub comanda nr. 373/1985
la ÎNTREPRINDEREA POLIGRAFICĂ CLUJ,
Municipiul Cluj Napoca

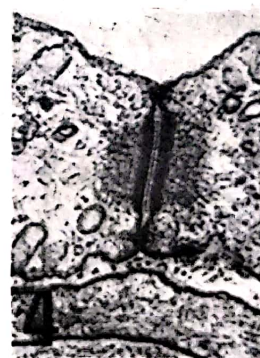
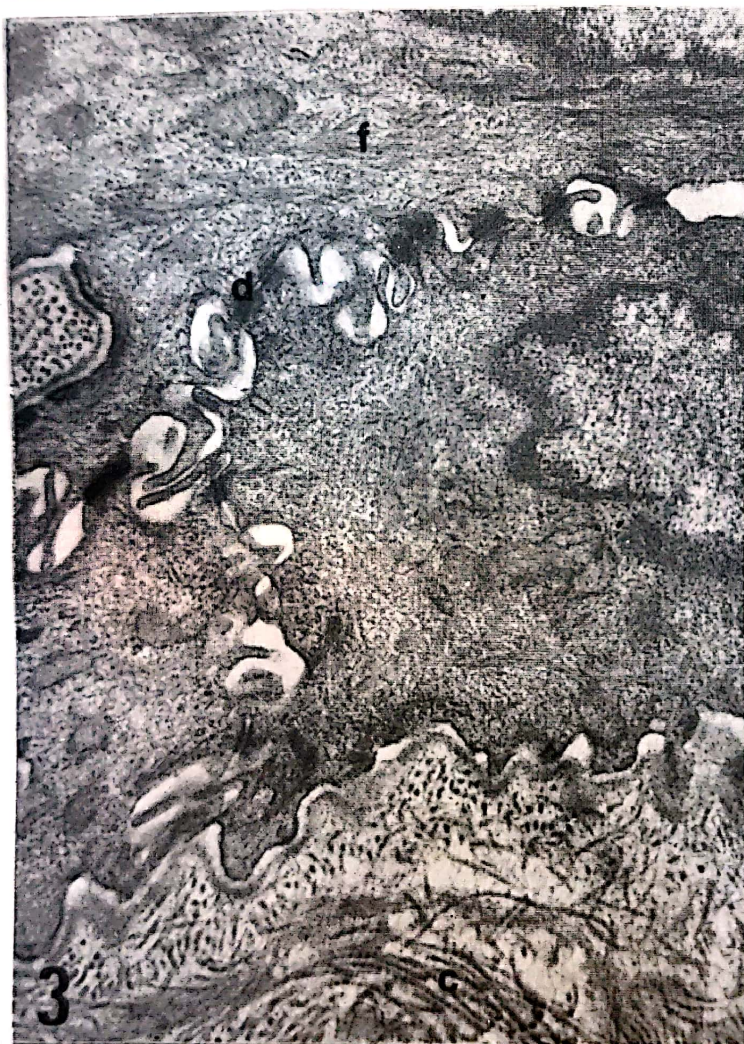


Foto 1. Rețea de microtrabecule într-o celulă în cultură observată la microscopul electronic cu voltaj supraînalt. 120.000 $\times$. (imagine primită de la prof. Keith Porter, Univ. din Boulder, Colorado).

Foto 2. Microtubuli observați în axoni amielinici din neurohipofiză de șoarece. 21.000 $\times$. (imagine primită de la dr. C. Crăciun, Univ. Cluj-Napoca).

Foto 3. Secțiune prin piele de șobolan; filamente de cheratină (f), desmozomi (d) în celule din stratul spinos și fibre de collagen (c) în derm. 21.000 $\times$. (imagine primită de la dr. Constantin Crăciun, Univ. Cluj-Napoca).

Foto 4. Desmozom (detaliu), 60.000 $\times$.



Foto 5. Fibre musculare striate din mușchi de pește; miofibrile (m) și mitocondrii (M). 42.000 $\times$. (imagine primită de la dr. C. Crăciun, Univ. Cluj-Napoca).

Foto 6. Secțiune printr-o celulă epitelială din mantaua de midie; cili (C) și microvili (mv). 12.000 $\times$. (imagine primită de la dr. C. Crăciun, Univ. Cluj-Napoca).

Foto 7. Secțiune transversală prin cili; se observă microtubulii din axonemă cu structura de tip „9+2”. 178.000 $\times$. (imagine primită de la dr. Constantin Crăciun, Univ. Cluj-Napoca).

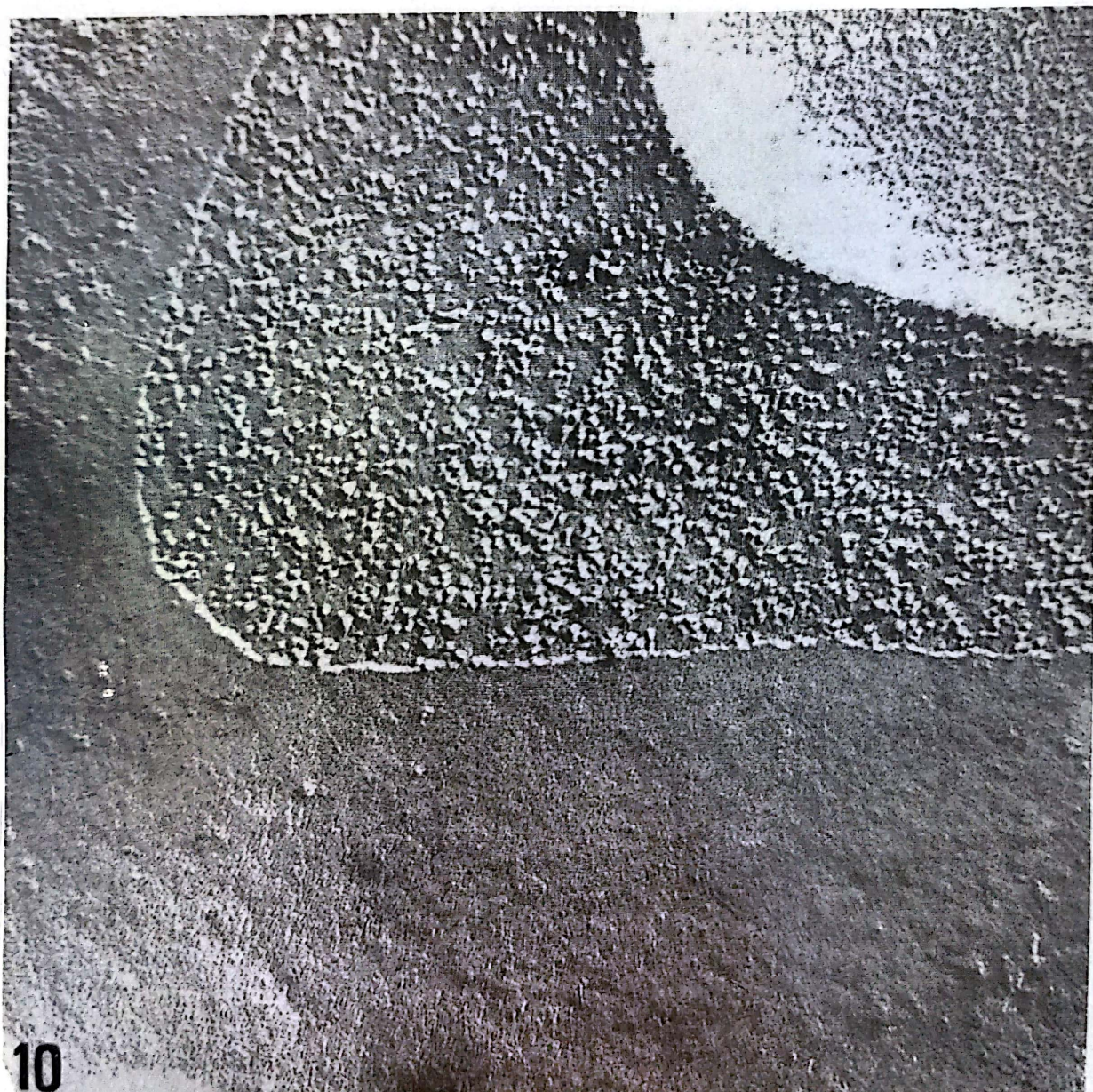
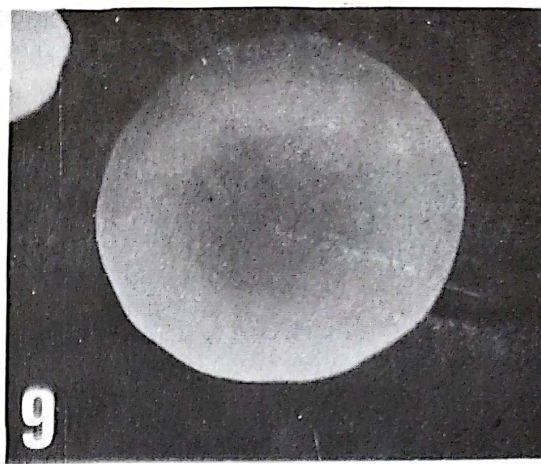
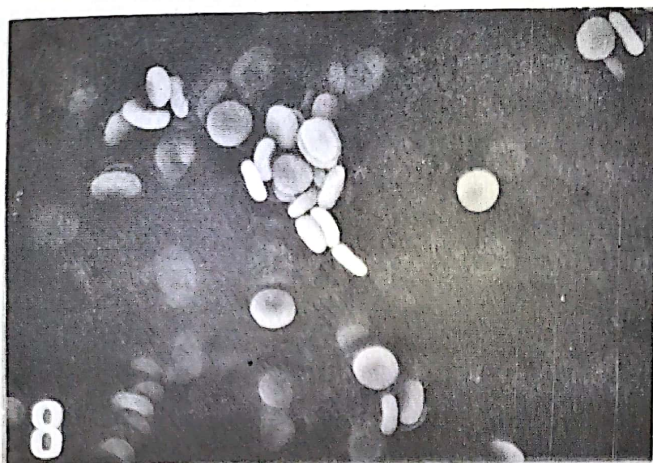


Foto 8. Hematii umane văzute la microscopul electronic cu baleiaj. (imagine realizată de autor la Colegiul Chelsea Univ. din Londra, în colab. cu dr. Anthony Brain și Malcolm Weinberg).

Foto 9. Detaliu mărit din imaginea prezentată în foto 8.

Foto 10. Replică a membranei hematiei umane înghețată și fracturată prezentind particule intramembranare. (imagine realizată de autor la Colegiul Chelsea Univ. din Londra, în colab. cu dr. Anthony Brain).

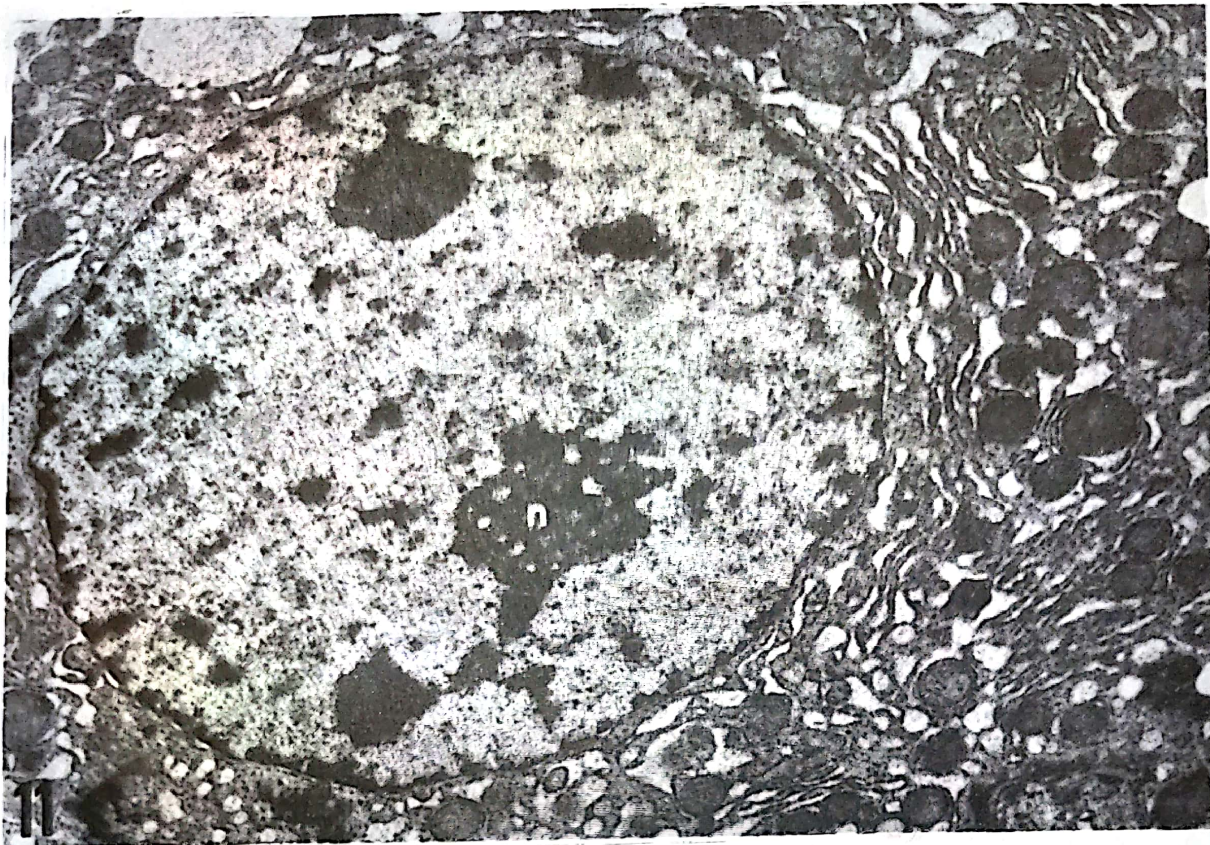


Foto 11. Nucleu cu nucleol (n) din hepatocit de șoarece. 12.000 $\times$. (imagine primită de la dr. Constantin Crăciun, Univ. Cluj-Napoca).

Foto 12. Pori (p) din membrana nucleară observați pe o secțiune tangențială la nucleu. 48.000 $\times$. (imagine primită de la dr. Constantin Crăciun, Univ. Cluj-Napoca).

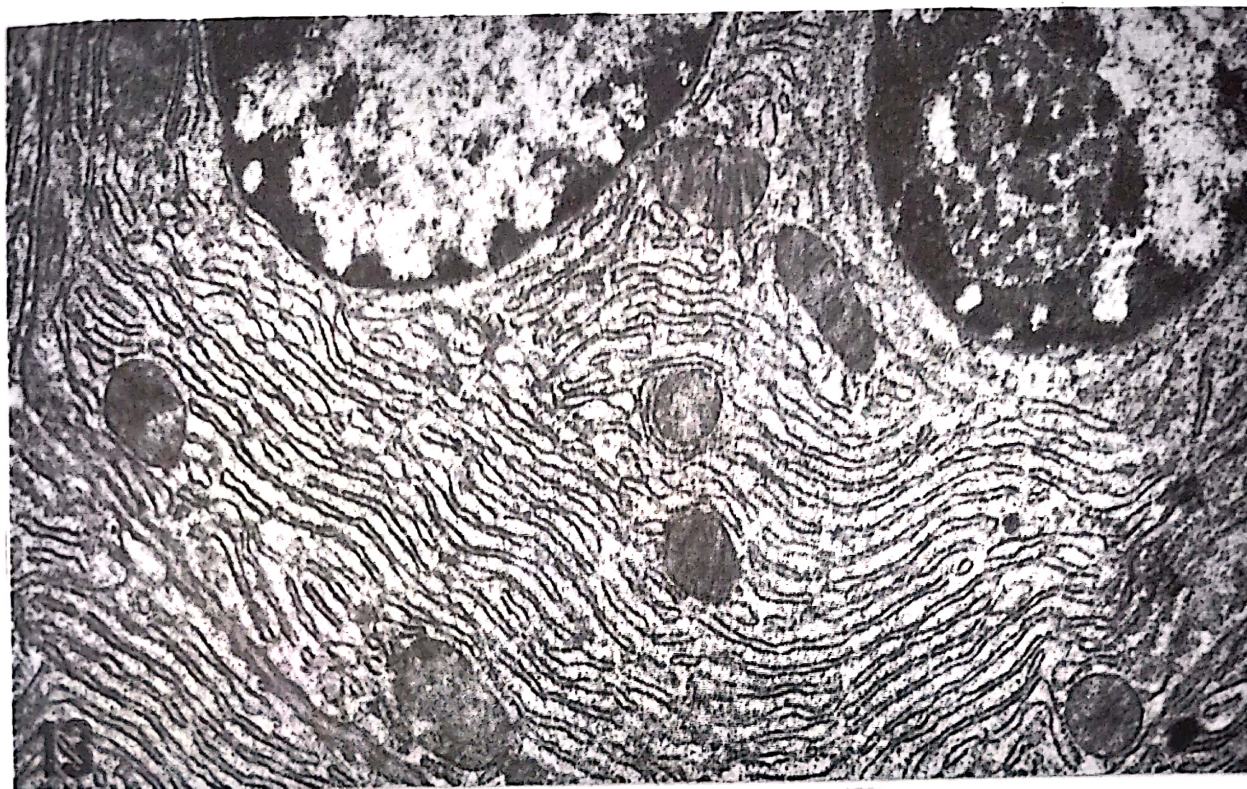


Foto 13. Reticolul endoplasmic rugos într-o celulă binucleată din pancreasul de șobolan. 21.000 $\times$. (imagine primită de la dr. Constantin Crăciun, Univ. Cluj-Napoca).

Foto 14. Ribozomi atașați de membrana reticulului endoplasmic rugos. 60.000 $\times$. (detaliu din imaginea prezentată în foto 13).

Foto 15. Poliribozomi (pr) liberi în citoplasma unei celule din neurohipofiză de șoarece. 21.000 $\times$. (imagine primită de la dr. Constantin Crăciun, Univ. Cluj-Napoca).

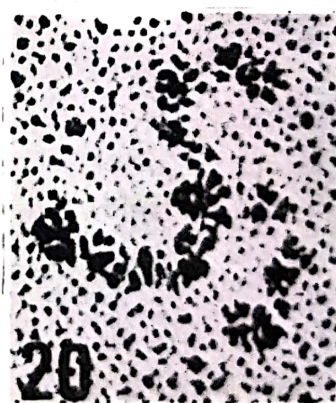
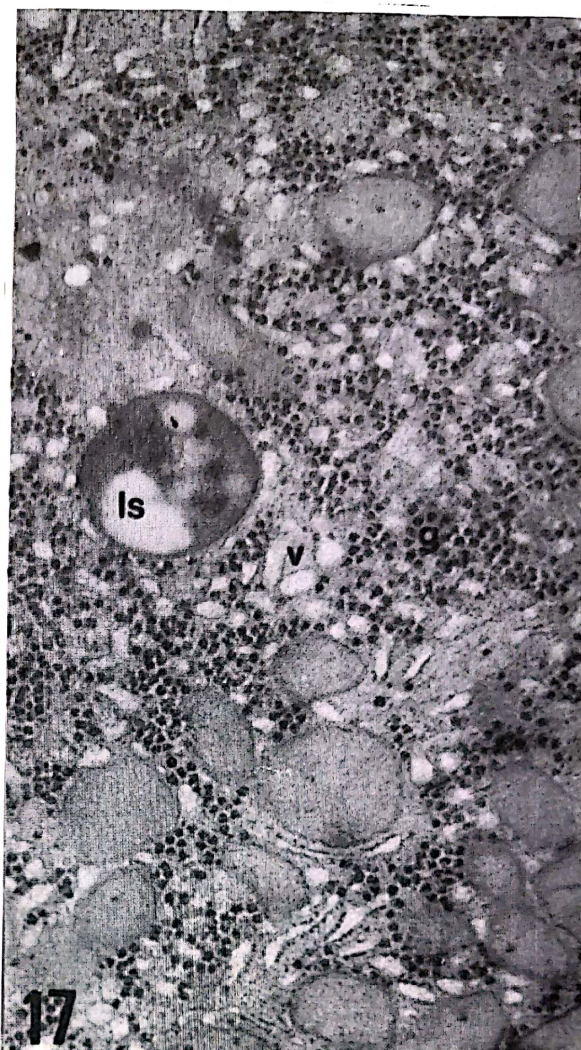
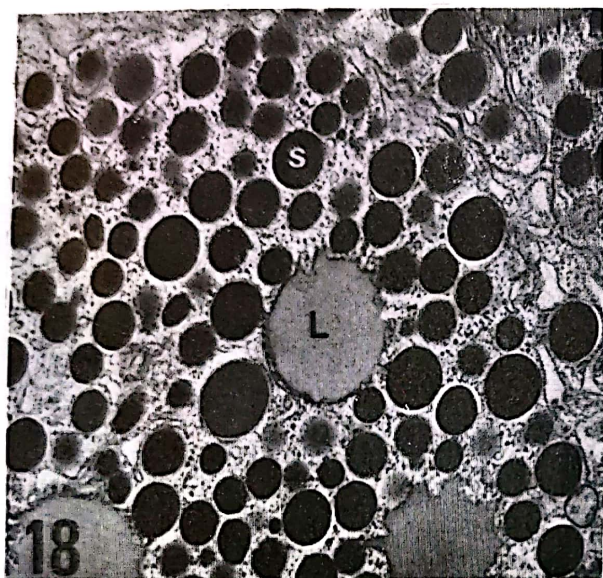
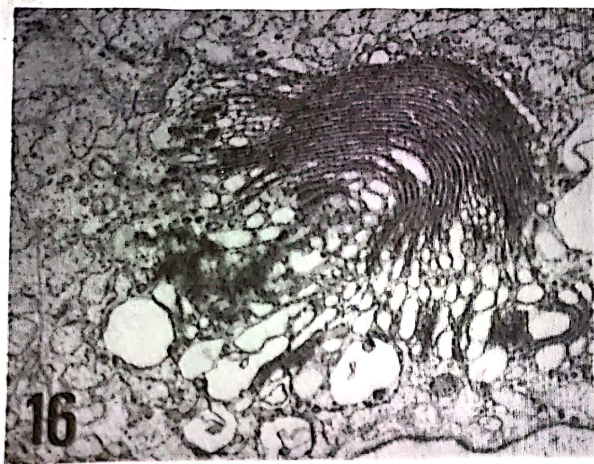


Foto 16. Aparat Golgi în celulă glandulară de crustaceu. 28.000 $\times$. (imagine primită de la dr. Constantin Crăciun, Univ. Cluj-Napoca).

Foto 17. Secțiune prin hepatocit de om; vezicule de reticul endoplasmic neted (v), lizozom secundar (ls) și granule de glicogen (g). 21.000 $\times$. (imagine primită de la dr. Constantin Crăciun, Univ. Cluj-Napoca).

Foto 18. Granule de secreție (s) și lipide (L) într-o celulă adipogranulară de midie. 10.000 $\times$. (imagine primită de la dr. Constantin Crăciun, Univ. Cluj-Napoca).

Foto 19. Secțiune la confluența pancreasului exocrin (cu reticul endoplasmic rugos —RER) și endocrin (cu granule de secreție conținând glucagon) de șobolan. 10.000 $\times$. (imagine primită de la dr. Constantin Crăciun, Univ. Cluj-Napoca).

Foto 20. Triskelion (ansamblu de trei molecule de clatrină ce formează învelișul veziculelor de endocitoză). 450.000 $\times$. (imagine primită de la prof. Danile Branton, Univ. Harvard, Massachusetts).

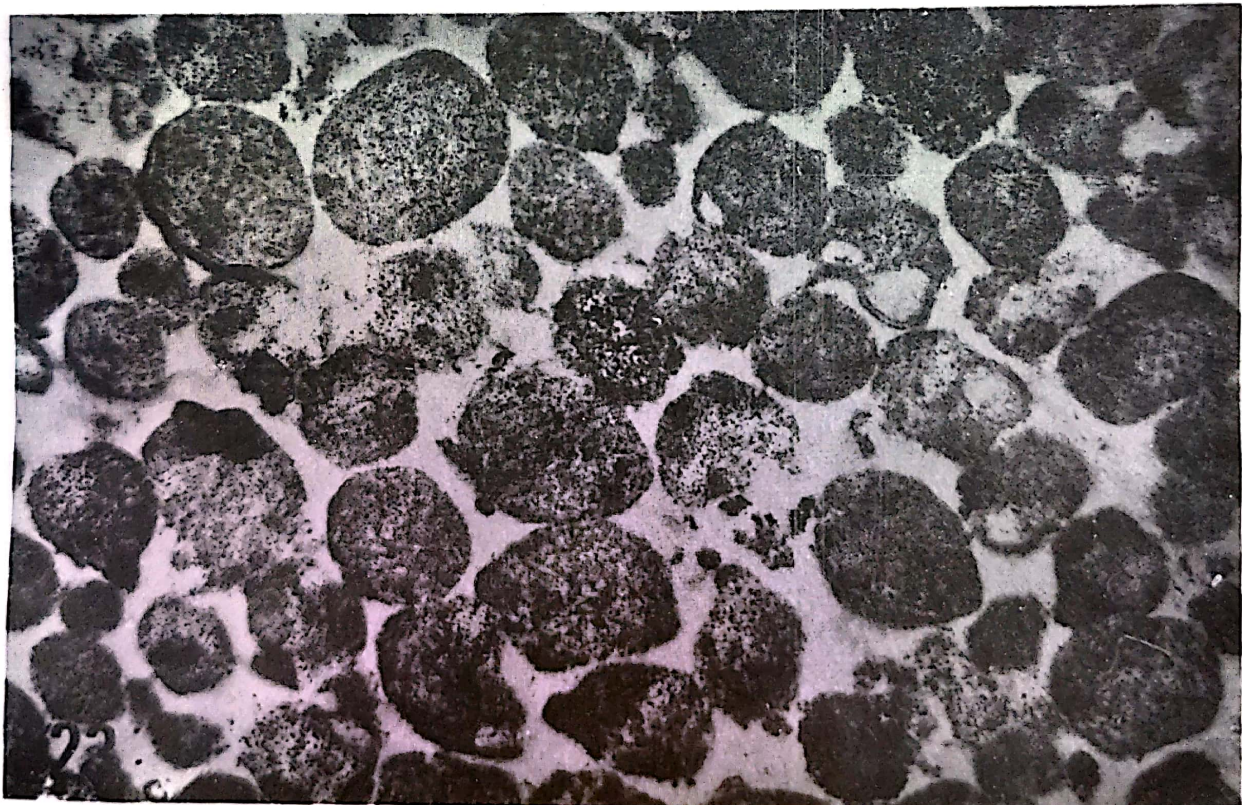
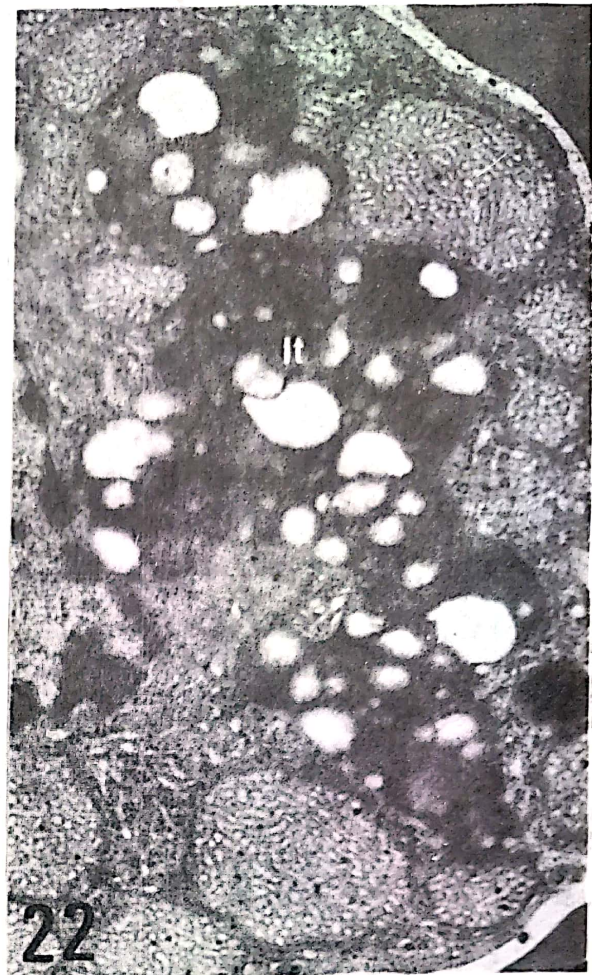
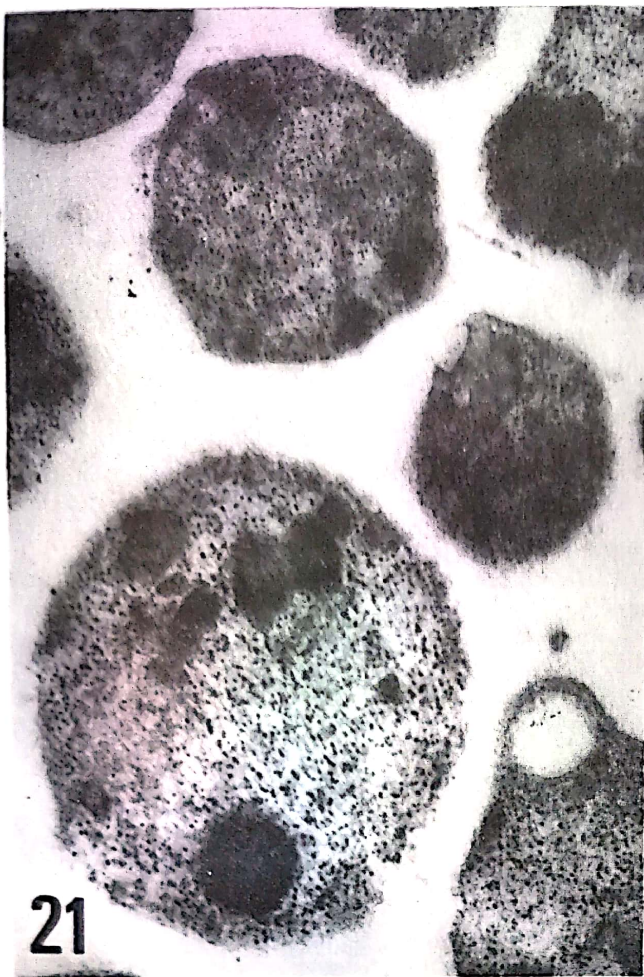


Foto 21. Lizozomi secundari din ficat de șobolan izolați prin centrifugare diferențială. (detaliu, 60.000 $\times$). Imagine primită de la prof. Christian de Duve și dr. P. Baudhuin, Univ. Louvain, Belgia.

Foto 22. Lizozomi terțiari (lt) într-o celulă din corticosuprarenală de șobolan. 21.000 $\times$. (imagine primită de la dr. Constantin Crăciun, Univ. Cluj-Napoca).

Foto 23. Lizozomi secundari din ficat de șobolan izolați prin centrifugare diferențială. 24.000 $\times$. (imagine primită de la prof. Christian de Duve și dr. P. Baudhuin, Univ. din Louvain, Belgia).

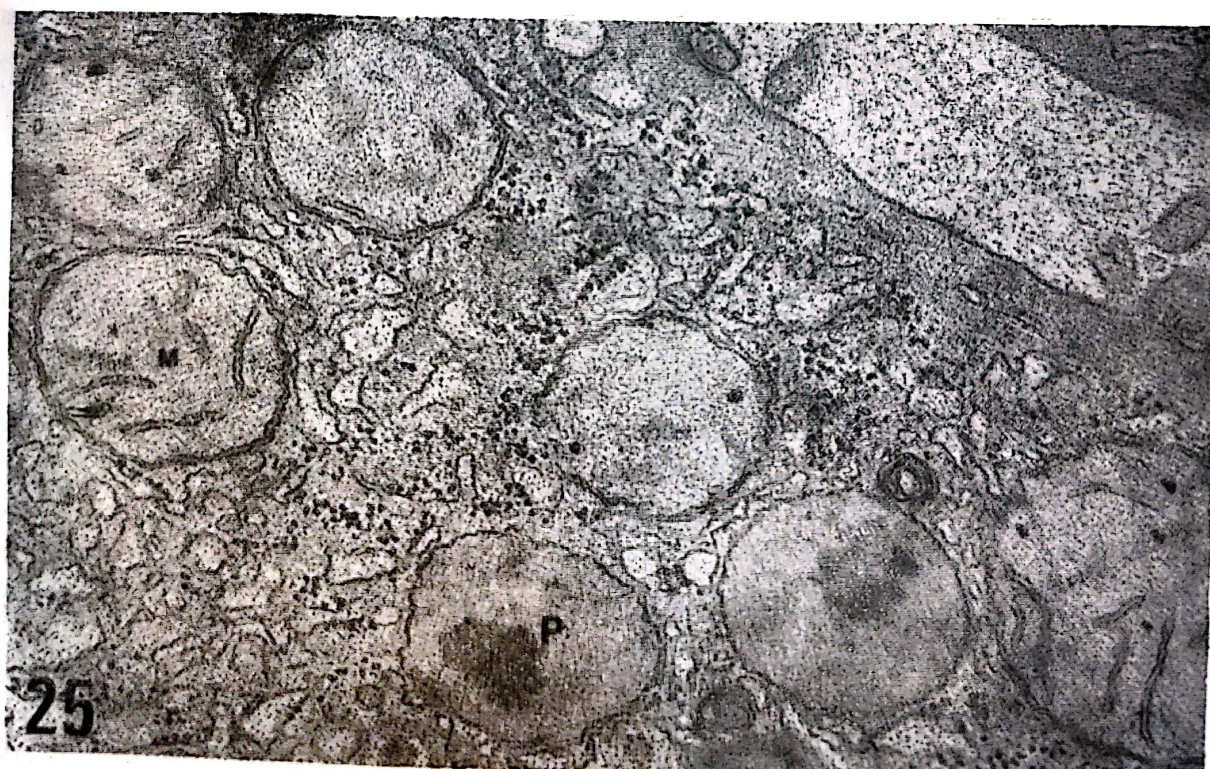
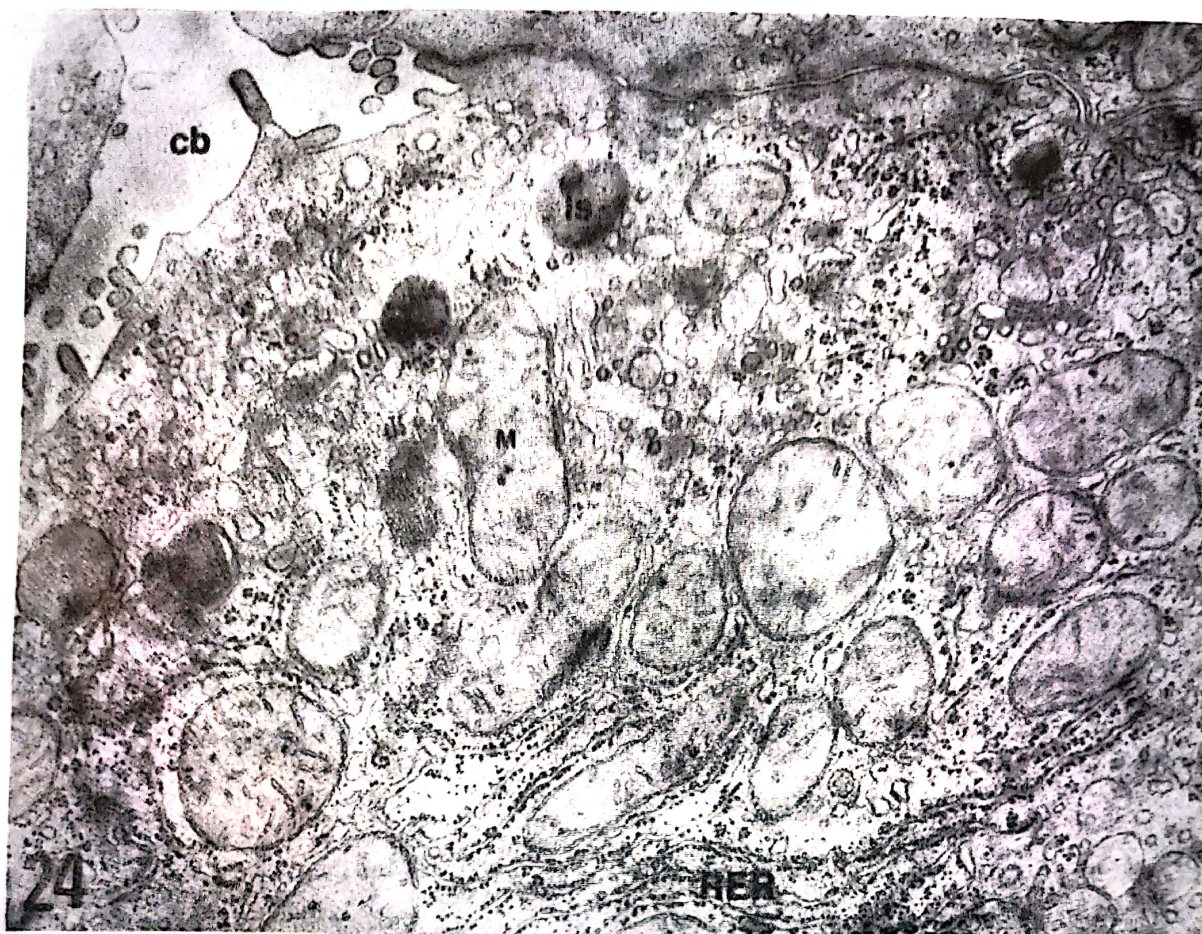


Foto 24. Secțiune prin hepatocit de șobolan; canalicul biliar (cb), lizozomi secundari (ls), peroxizom (P), mitocondrii (M) și reticul endoplasmic rugos (RER). 20.500 $\times$. (imagine primită de la prof. Christian de Duve și dr. P. Baudhuin, Univ. Louvain, Belgia).

Foto 25. Peroxizomi (P) și mitocondrii (M) în hepatocit de șobolan. 43.000 $\times$. (imagine primită de la prof. Christian de Duve și dr. P. Baudhuin, Univ. din Louvain, Belgia).

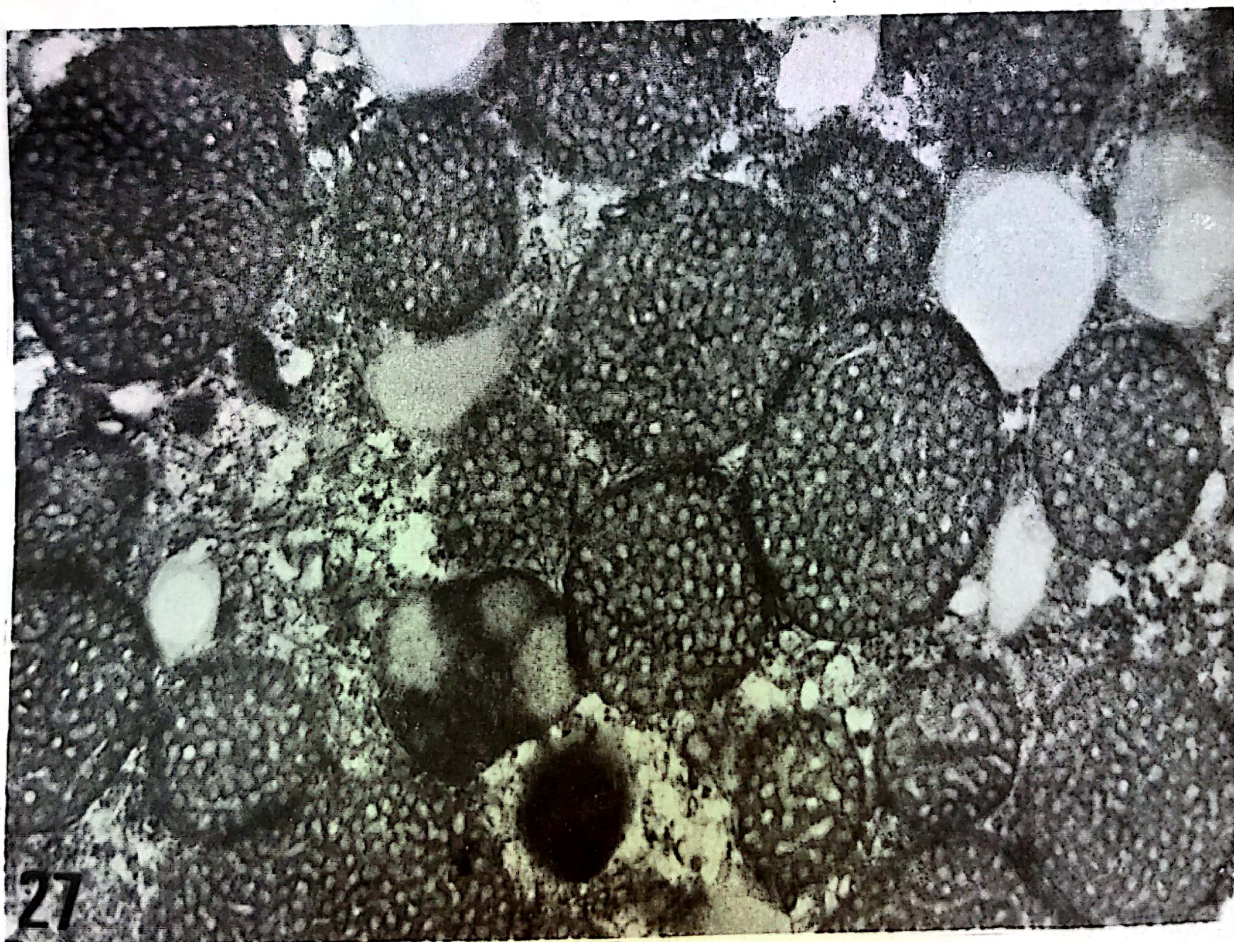
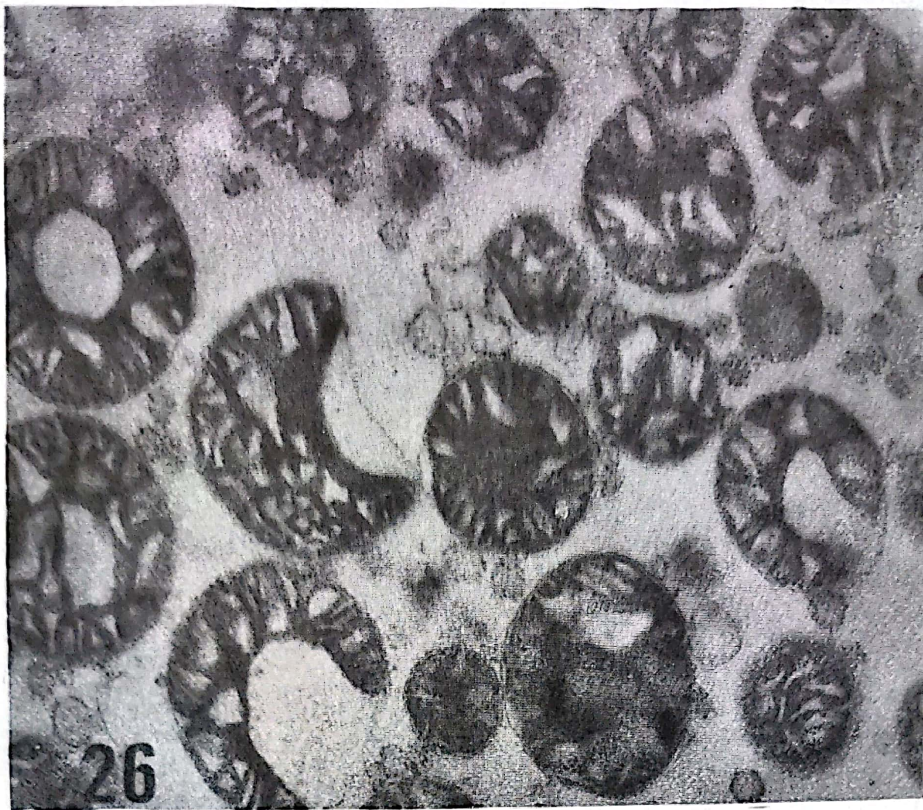


Foto 26. Mitocondrii din ficat uman izolate prin centrifugare diferențială, 29.000 $\times$.
(imaginea autorului).

Foto 27. Mitocondrii cu creste tubulare într-o celulă din corticosuprarenală. 36.000 $\times$.
(imagine primită de la dr. Constantin Crăciun, Univ. Cluj-Napoca).

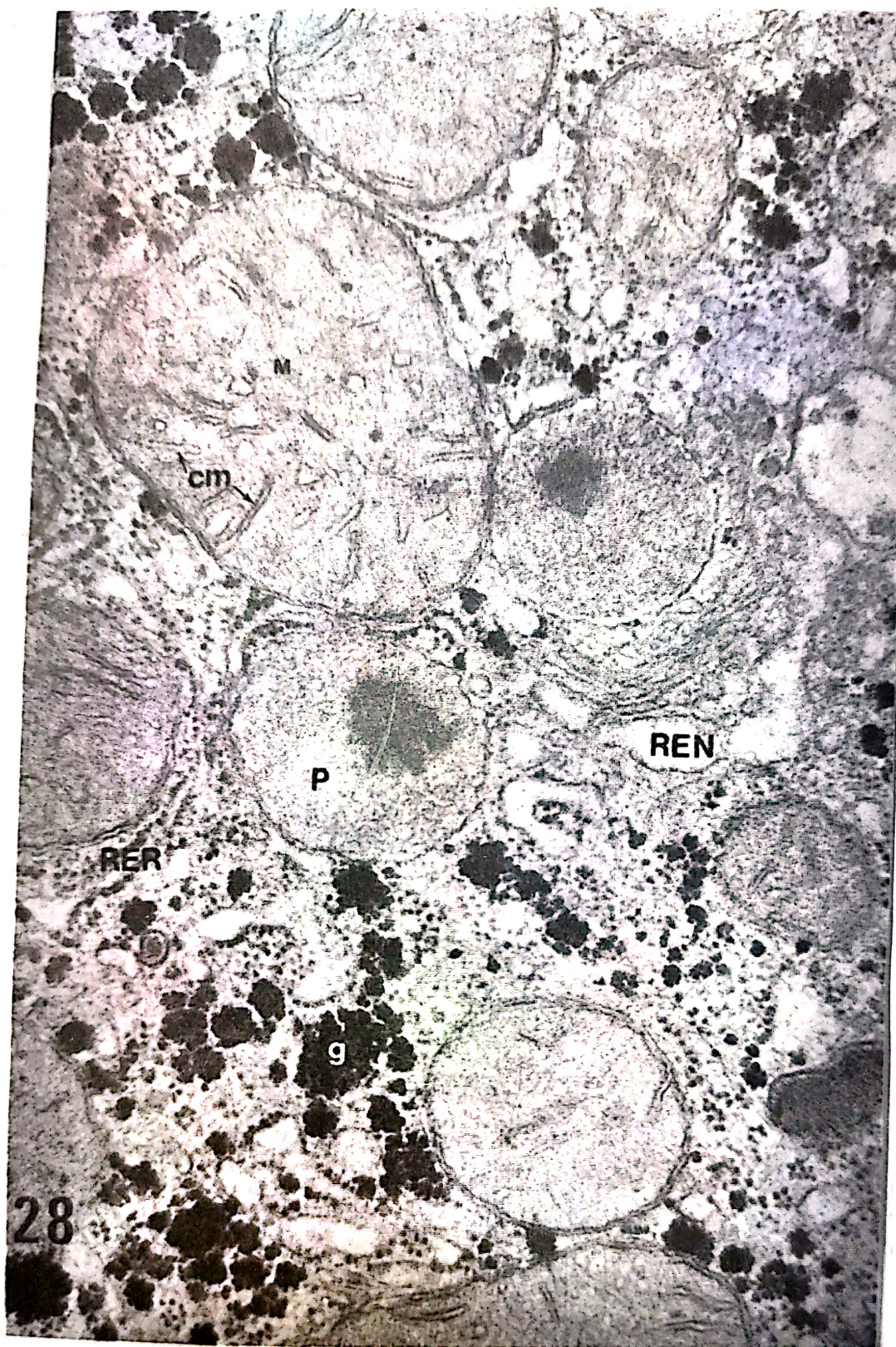


Foto 28. Secțiune prin hepatocit de șobolan; peroxizomi (P), mitocondrii (M) cu creste mitocondriale (cm), reticul endoplasmic rugos (RER), reticul endoplasmic neted (REN) și glicogen (g). 47.000 $\times$. (imagine primită de la prof. Paul Lazarow și dr. Helen Shio, Univ. Rockefeller, New York).

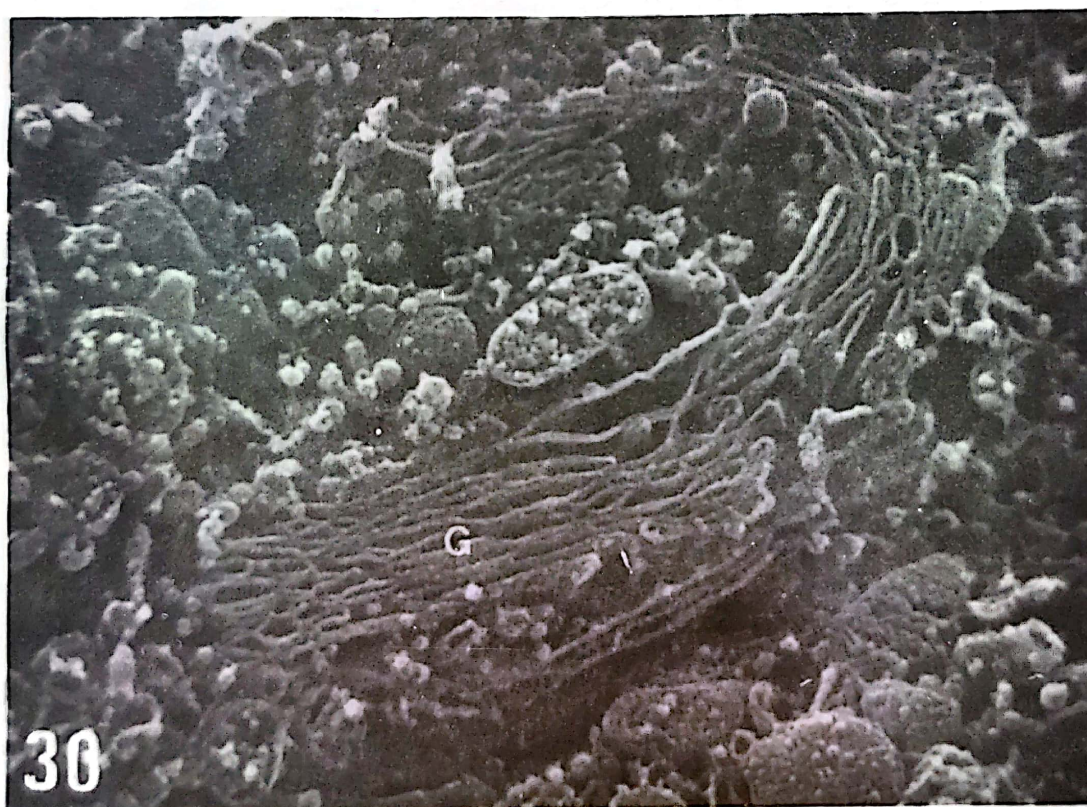
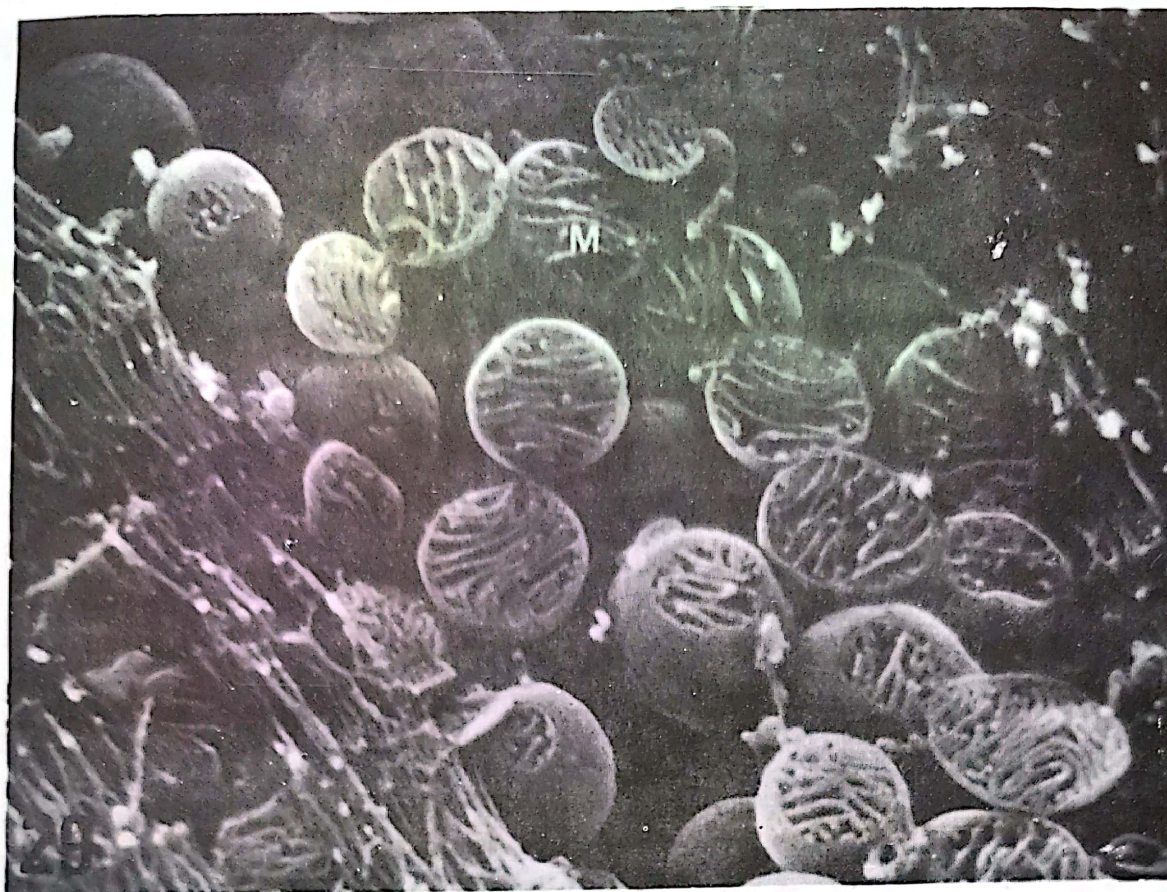


Foto 29. Mitocondrii (M) văzute prin microscopie electronică cu baleiaj într-o celulă crio fracturată din miocard de iepure. 27.000 $\times$. (imagine primită de la prof. Keiichi Tanaka și dr. Y. Masunaga, Univ. Tomori, Yomago).

Foto 30. Aparat Golgi (G) văzut prin microscopie electronică cu baleiaj într-o celulă crio fracturată din epididim de șobolan. 86.000 $\times$. (imagine primită de la prof. Keiichi Tanaka și dr. Y. Kinose, Univ. Tomori, Yomago).

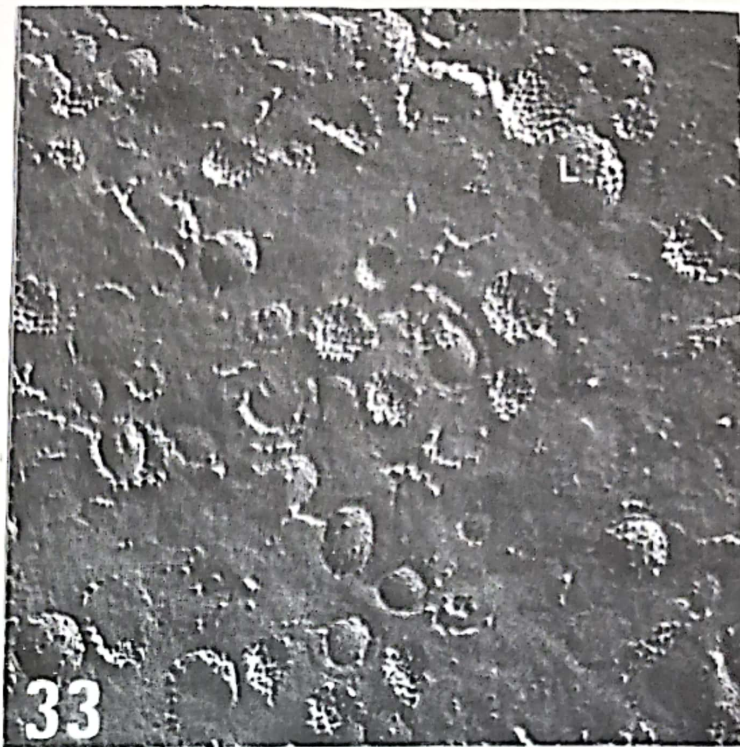


Foto 31. Bacterii *Halobacterium halobium* văzute la microscopul optic. 1.850 $\times$.

Foto 32. Replică a membranei bacteriei *H. halobium* înghețată și fracturată prezentând particule de bacteriorodopsină. 87.000 $\times$.

Foto 33. Vezicule lipidice (lipozomi) conținând bacteriorodopsină examinate prin tehnica crio fracturării. 77.000 $\times$. (imaginile 31—33 sînt primite de la prof. Walter Stoeckenius, Univ. California, San Francisco).